

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/029631 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009968

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. September 2003 (08.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 42 016.5 11. September 2002 (11.09.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): ESPLORA GMBH [DE/DE]; c/o TU Darmstadt, In-
stitut für Biochemie, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WOLF, Sabine
[DE/DE]; Otzbergstrasse 44, 64853 Otzberg/Lengfeld
(DE). JÄGER, Martina [DE/DE]; Gartenstrasse 1,
64367 Mühlthal (DE). BANGSOW, Thorsten [DE/DE];
Rheinstrasse 72, 64572 Büttelborn-Worfelden (DE).
BANGSOW, Carmen [DE/DE]; Rheinstrasse 72,
64572 Büttelborn-Worfelden (DE). JORDAN, Dominik

[DE/DE]; Welzbachring 16, 63762 Pflaumheim (DE).
PELZER, Bernhard [DE/DE]; Heinrich-Delp-Strasse
58A, 64297 Darmstadt (DE). OPPOLZER, Thomas
[DE/DE]; Martinstrasse 62, 64285 Darmstadt (DE).

(74) Anwalt: HIEBL, Inge; Kraus & Weisert, Thomas-Wim-
mer-Ring 15, 80539 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING BHS-SPECIFIC PROTEINS AND FRAGMENTS THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG BHS-SPEZIFISCHER PROTEINE UND FRAGMENTE DAVON

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for identifying the presence of a BHS-specific protein/fragment in cerebral capillary endothelial cells, characterized in that a) cerebral endothelial cells freshly isolated from the brain are pre-cleaned by enzymatic decomposition in the usual manner; b) the decomposition obtained in step a) is treated with a lysis buffer which substantially destroys the erythrocytes and apoptotic cells and enables at least 70 % of the cerebral capillary endothelial cells to be obtained in a vital form; c) optionally, the product obtained in step b) is further cleaned; d) a subtractive cDNA bank is produced from the cerebral capillary endothelial cells and a subtraction tissue; e) a cDNA subtraction is performed by means of differential hybridization(s); f) clones from the subtractive cDNA bank are verified with regard to the respective expression thereof by differential hybridization; g) a full cDNA sequence is established for the BHS-specific clones from the subtractive cDNA bank and h) the expression pattern of the analysed clone is compared in relation to fresh and cultivated cerebral capillary endothelial cells, whereupon the presence of BHS-specific proteins/fragments are identified in addition to the proteins and fragments thereof identified according to said method.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins/Fragments in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt, b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lysepuffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70 % der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält, c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt, d) eine subtraktive cDNA-Bank aus den Hirnkapillar-Endothelzellen und einem Subtraktionsgewebe herstellt, e) eine cDNA-Subtraktion mittels differentieller Hybridisierung(en) durchführt, f) Klone aus der subtraktiven cDNA-Bank durch differentielle Hybridisierung hinsichtlich ihrer jeweiligen Expression verifiziert, g) zu den BHS-spezifischen Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank eine vollständige cDNA-Sequenz erstellt und h) das Expressionsmuster der untersuchten Klone zwischen frischen und kultivierten Hirnkapillar-Endothelzellen vergleicht und so die Anwesenheit BHS-spezifischer Proteine/Fragmente identifiziert sowie die mit diesem Verfahren identifizierten Proteine und Fragmente davon.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/029631 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

5 Verfahren zur Identifizierung BHS-spezifischer Proteine und
 Fragmente davon

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung der
Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments
davon in Hirnkapillar-Endothelzellen sowie die mit diesem
Verfahren erhaltenen Proteine oder Fragmente davon
(BHS = Blut-Hirn-Schranke). Ferner betrifft die Erfindung auch
die mit diesem Verfahren erhaltenen Gene bzw. Transkripte.

15 Die Endothelzellen von cerebralen Kapillaren bilden eine
selektive Permeabilitätsbarriere zwischen dem Blut und dem
Gehirn eines Organismus, die so genannte Blut-Hirn-Schranke
(BHS). Innerhalb der Kapillaren sind einzelne Endothelzellen
um das Lumen herum angeordnet und bilden einen zylindrischen,
20 röhrenförmigen Hohlraum. Enge Verbindungen zwischen den ein-
zelnen Endothelzellen und mit den Endothelzellen assoziierten
anderen Zelltypen verhindern den unkontrollierten passiven
Durchtritt einer Vielzahl von Substanzen durch diese Zell-
schicht.

25 Zur Aufrechterhaltung seiner Funktion ist das Gehirn in hohem
Maße auf ein konstantes inneres Milieu angewiesen, das durch
die Blut-Hirn-Schranke gewährleistet wird. Diese reguliert
auch den Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn. Spezifische
Transportsysteme vermitteln diesen Austausch. Die Ausbildung

dieser Barriere in den Endothelzellen der Hirnkapillaren (brain microvessel endothelial cells, BMEC) ist in der Expression spezifischer Proteine in diesem hochdifferenzierten Zelltyp im Vergleich zu anderen Endothelzellen begründet. Es sind bereits einige für die Blut-Hirn-Schranke spezifische Proteine bekannt, zum Beispiel der Glucosetransporter GLUT-1, der spezifisch für die BMEC ist und die Energieversorgung des Gehirns gewährleistet.

Aufgrund der selektiven Permeabilitätseigenschaften der Blut-Hirn-Schranke ist es schwierig, verschiedene Krankheiten des zentralen Nervensystems zu behandeln, da zahlreiche Arzneimittel die Blut-Hirn-Schranke kaum durchdringen und somit an ihrem Wirkort im Gehirn nur in geringer Konzentration ankommen. Für die Entwicklung von im Gehirn wirkenden Arzneimitteln wäre es daher von großer Bedeutung, die Funktionsweise der Blut-Hirn-Schranke und der daran beteiligten Proteine zu kennen. Insbesondere wäre es von Bedeutung, Kenntnis derjenigen Proteine zu erlangen, die gegenüber anderen Zelltypen in den Hirnkapillar-Endothelzellen in besonders hohem oder besonders geringem Maße oder aus bestimmten Spleißvarianten hergestellt werden bzw. spezifische posttranslationale Modifikationen aufweisen.

Die Untersuchung von Hirnkapillar-Endothelzellen ist mit verschiedenen Problemen verbunden. Zum einen steht insbesondere zur Untersuchung der Proteinexpression im menschlichen Gehirn nicht genügend Hirnmaterial zur Verfügung, wobei unter anderem auch ethische Gründe eine Rolle spielen. Ferner sind die einzelnen Individuen, von denen die Hirnmasse abstammt, in der Regel sehr verschieden im Hinblick auf ihre genetische Information. Unterschiede ergeben sich beispielsweise bzgl. Alter, Geschlecht, Gewicht, Rasse etc. Ferner muss das Untersuchungsmaterial innerhalb der ersten Stunden nach Eintritt

des Todes entnommen werden, denn nach diesem Zeitraum findet bereits eine erhebliche Veränderung der Proteinzusammensetzung in den Zellen durch enzymatische Ab- und Umbauvorgänge statt. Bisherige Verfahren zur Untersuchung der Proteinexpression in Hirnkapillar-Endothelzellen sind überdies mit dem Problem behaftet, dass das Untersuchungsmaterial nicht in ausreichender Reinheit für direkte Untersuchungen gewonnen werden kann. Bei der Isolierung von Hirnkapillar-Endothelzellen nach dem bekannten Verfahren erhält man üblicherweise ein Gemisch mit anderen Zelltypen, so dass Untersuchungen des Proteinexpressionsmusters an diesen Proben keine ausreichende Zuordnung ausschließlich zu den Hirnkapillar-Endothelzellen erlauben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem BHS-spezifische Proteine oder Fragmente davon eindeutig identifiziert werden können. Das Verfahren soll sich insbesondere zur Identifizierung BHS-spezifischer Proteine bzw. Gene in Hirnkapillar-Endothelzellen eignen. Weiterhin soll das Verfahren einfach und schonend durchführbar sein. Ferner soll das erfindungsgemäße Verfahren selektiv für Proteine oder Fragmente davon sein, die verstärkt oder ausschließlich in Hirnkapillar-Endothelzellen gebildet werden und nicht in einem Vergleichsgewebe bzw. verwandten Zelltyp. Des Weiteren sollen sich die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Proteine oder Fragmente davon als diagnostische Marker für Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke einher gehen, eignen. Ferner sollen sich die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Proteine zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke einhergehen, eignen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen

Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt, b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lysepuffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält, c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt, d) eine subtraktive cDNA-Bank aus den Hirnkapillar-Endothelzellen und einem Subtraktionsgewebe herstellt, e) eine cDNA-Subtraktion mittels eines oder mehrerer differentieller Hybridisierungsschritte durchführt, f) Klone aus der subtraktiven cDNA-Bank durch differentielle Hybridisierung hinsichtlich ihrer jeweiligen Expression verifiziert, g) zu den BHS-spezifischen Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank die cDNA-Sequenz ergänzt und h) das Expressionsmuster der untersuchten Klone zwischen frischen und kultivierten Hirnkapillar-Endothelzellen vergleicht und so die Anwesenheit BHS-spezifischer Proteine oder Fragmente davon identifiziert.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt, b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lysepuffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält, c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt, d) das in Stufe c) erhaltene Produkt in einem geeigneten Puffer solubilisiert, e) eine isoe-

lektrische Fokussierung durchführt, f) die Proben aus der isoelektrischen Fokussierung in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht auftrennt, g) differentielle Spots identifiziert und isoliert, h) mit dem Isolat von g) eine massenspektrometrische Analyse durchführt, und i) hiervon eine Auswertung mittels gezielter Datenbankanalyse vornimmt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich BHS-spezifische Proteine oder Fragmente davon eindeutig und zuverlässig identifizieren und die Erfindung betrifft auch die mit diesem Verfahren isolierten Proteine sowie die diese Proteine kodierenden Transkripte bzw. Gene. Insbesondere betrifft die Erfindung auch die nach diesem Verfahren isolierten Proteine mit den Sequenzen SEQ ID NO: 5, 14, 19, 23, 27, 33, 53.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Proteine bzw. Fragmente davon zur Herstellung von Mitteln oder Medikamenten zur Diagnose oder Therapie von Erkrankungen, die auf einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Kombination der vorstehend genannten Verfahrensschritte die eindeutige Identifizierung BHS-spezifischer Proteine in Hirnkapillar-Endothelzellen erlaubt. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Proteine sind für die BHS spezifisch. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Proteine besitzen aufgrund ihrer Spezifität für die BHS eine Funktion in bzw. an der BHS. Bei dieser Funktion kann es sich beispielsweise um eine Barrierefunktion, eine Transportfunktion, eine Funktion im Zusammenhang mit der Nährstoffversorgung der BHS, eine Funktion als Tight-Junction-Protein, eine enzymatische Aktivität etc. handeln. Somit ist es möglich, ausgehend von der Identifizierung der Anwesenheit dieser Proteine gezielt spezifische Funktionen davon in der BHS abzuleiten. Dies

fische Funktionen davon in der BHS abzuleiten. Dies eröffnet die Möglichkeit gänzlich neuer Therapiekonzepte, die darauf beruhen, dass Substanzen gezielt durch die BHS geschleust werden können. Ferner können die mit dem erfindungsgemäßen
5 Verfahren identifizierten Proteine gezielt Gegenstand therapeutischer Interventionen sein. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt erstmalig die Entwicklung von therapeutischen Konzepten für das Gehirn betreffende Erkrankungen. Weiterhin kann der Nachweis von Veränderungen in den nach dem beschriebenen
10 Verfahren identifizierten Proteinen zur Diagnose von Krankheiten benutzt werden, die auf einer Dysfunktion der BHS basieren.

Von besonderer Bedeutung bei den erfindungsgemäßen Verfahren ist die Verwendung von frisch isolierten BMEC (Primärzellen)
15 anstelle von kultivierten BMEC. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass BMEC in Kultur sehr schnell dedifferenzieren, d.h. ihre BHS-Eigenschaften sehr schnell verlieren. Ferner wurde auch gefunden, dass die Expression der für die Blut-Hirn-Schranke spezifischen Proteine in kultivierten Hirnkapil-
20 lar-Endothelzellen stark herabreguliert ist und nach nur wenigen Passagen völlig verschwindet, wodurch keine zuverlässige Isolierung und Identifizierung BMEC spezifischer Proteine möglich ist. Außerdem müssen reine und vitale Zellen isoliert werden, um Zellspezifität zu gewährleisten und negative oder
25 das Ergebnis verfälschende Effekte durch Apoptose zu verhindern.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann die Entnahme von Gehirnmaterial aus dem jeweiligen Organismus durch operativen Eingriff in den lebenden Organismus erfolgen. Auf diese Weise
30 können beispielsweise auch Hirnproben vom menschlichen Organismus bei Hirnoperationen erhalten werden. Vorteilhafter ist jedoch die Entnahme des vollständigen Gehirns oder von Teilen

davon aus dem Organismus möglichst unmittelbar nach Eintritt des Todes. Bevorzugt wird das Gehirn in einem Zeitraum von höchstens einer Stunde, bevorzugter etwa höchstens 30 Minuten, noch bevorzugter etwa höchstens 15 Minuten oder noch weiter
5 bevorzugter etwa 5 Minuten nach Eintritt des Todes entnommen. Das Gehirn kann beliebigen Lebewesen entnommen werden, beispielsweise dem Menschen, Rindern, Schafen, Ziegen, Pferden etc. Es wurde nun gefunden, dass Schweinehirne ein gutes Modell für das menschliche Gehirn im Hinblick auf die Untersu-
10 chung der Hirnkapillar-Endothelzellen auf BHS-spezifische Proteine sowie der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen darstellen.

Das Schweinehirn ist zum menschlichen Gehirn sowohl bezüglich der Anatomie als auch der Morphologie sehr ähnlich. Ferner
15 sind generell Sequenzhomologien zwischen Mensch und Schwein sowohl auf Protein- als auch auf Nukleinsäureebene sehr hoch, so dass sich an Schweinematerial erhaltene Ergebnisse zuverlässig auf den Menschen übertragen lassen und umgekehrt. Dies ist darin begründet, dass Mensch und Schwein phylogenetisch
20 näher verwandt sind als Mensch und klassische Modellorganismen wie Maus oder Ratte.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein hypotonischer Lysepuffer nicht nur Erythrozyten lysiert, sondern auch allgemein tote und apoptotische Zellen durch hypotonischen Schock
25 platzen lässt. Der bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zu verwendende Lysepuffer erhält wenigstens 70 %, bevorzugt 80 %, bevorzugter 90 %, noch bevorzugter 95 % der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form. Ferner muss der Lysepuffer ungiftig sein und einen pH-Wert im physiologischen Bereich
30 besitzen. Der erfindungsgemäß verwendete hypotonische Puffer sollte eine Ionenstärke von 0,1-0,2 M besitzen, ein- und zweiwertige Anionen bzw. Kationen enthalten und in einem pH-

Bereich von 7,0-8,0 puffern. Alle enthaltenen Substanzen müssen ungiftig für die Zellen sein, so dass gesunde Zellen in dem Puffer für kurze Zeit nicht geschädigt werden. Bevorzugt enthält der hypotonische Puffer mit einer Ionenstärke von 0,1-
s 0,2 M Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium-, Magnesium-, Chlorid- und Sulfat-Ionen sowie Glukose und puffert in einem pH-Bereich von 7,0-8,0. Dies erlaubt eine selektive Anreicherung vitaler Hirnkapillar-Endothelzellen aus einem Gemisch von Erythrozyten und anderen Zellen variierender Vitalität. Der
10 erfindungsgemäß verwendete Puffer besitzt bevorzugt die folgende Zusammensetzung bei einem pH-Wert von 7,5:

Ion/Substanz	min. Konz. [mM]	max. Konz. [mM]
Na ⁺	30,0	60,0
K ⁺	5,0	7,5
NH ₄ ⁺	80,0	100,0
Ca ²⁺	1,0	2,0
Mg ²⁺	6,0	9,0
Cl ⁻	125,0	175,0
HCO ₃ ⁻	4,5	6,5
H ₂ PO ₄ ⁻	0,5	2,5
SO ₄ ²⁻	0,3	0,6
HPO ₄ ²⁻	0,4	0,7
Glukose	1,5	3,0

Bevorzugter besitzt der eingesetzte Lysepuffer die folgende Zusammensetzung:

NaCl	30 mM	bis	50 mM
KCl	4,5 mM	bis	5,5 mM
NH ₄ Cl	80 mM	bis	100 mM
CaCl ₂	1,0 mM	bis	2,0 mM
MgCl ₂	0,6 mM	bis	0,8 mM
MgSO ₄	0,3 mM	bis	0,6 mM

NaHCO ₃	4,5 mM	bis	6,5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,2 mM	bis	0,45 mM
Na ₂ HPO ₄	0,4 mM	bis	0,65 mM
KH ₂ PO ₄	0,1 mM	bis	0,15 mM
Glucose	1,5 mM	bis	3,0 mM

Besonders bevorzugt besitzt der Puffer die folgende Zusammensetzung:

NaCl	39 mM
KCl	5,1 mM
NH ₄ Cl	88 mM
CaCl ₂	1,6 mM
MgCl ₂	0,69 mM
MgSO ₄	0,46 mM
NaHCO ₃	5,6 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
Na ₂ HPO ₄	0,53 mM
KH ₂ PO ₄	0,12 mM
Glucose	2,24 mM

5

Normalerweise werden derartige Lysepuffer zur Isolierung von Lymphozyten bzw. von RNA aus Lymphozyten eingesetzt, indem hierbei zuerst die Erythrozyten lysiert werden. Weder die Zusammensetzung des erfindungsgemäß verwendeten Puffers noch die Anwendung eines derartigen Puffers zur Lyse apoptotischer Zellen wurde bisher beschrieben.

10

Die selektive Lyse apoptotischer Zellen ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren von wesentlicher Bedeutung, um BHS-spezifische Transkripte anzureichern ohne dabei gleichzeitig Transkripte von Genen anzureichern, die verstärkt während der Apoptose exprimiert werden. Bei anderen Verfahren zur Isolierung von Zellen wird das Problem der Apoptose dadurch umgangen, indem die isolierten Zellen in Kultur genommen werden. Hirnkapillar-Endothelzellen verändern jedoch in Kultur ihre Eigenschaften, was zu einem veränderten Genexpressionsmuster führt. Somit erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren zur Zellpräparation durch den abschließenden Lyseschritt erstmalig und gezielt die Isolierung ausreichender Mengen an frischen Hirnkapillar-Endothelzellen.

Nach Entnahme des Gehirns aus dem Organismus wird dieses zweckmäßigerweise in einen geeigneten Puffer überführt und auf Eis gekühlt schnellstmöglich zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert. Die zu isolierenden Hirnkapillar-Endothelzellen befinden sich im Wesentlichen in der grauen Hirnsubstanz. Vor der weiteren Aufreinigung der Zellen wird daher bevorzugt die graue Hirnsubstanz mechanisch aus den übrigen Hirnteilen herauspräpariert. Hierfür wird zunächst die Hirnhaut abgezogen und die graue Hirnsubstanz abgeschabt, zerkleinert und in ein geeignetes Medium überführt. Ein geeignetes Medium ist z.B. M199-Medium (Gibco/BRL, Grand Island, NY) oder Earle's Puffer. Vor der weiteren Aufreinigung ist es zweckmäßig, die Masse der erhaltenen grauen Hirnsubstanz zu bestimmen.

Earle's Puffer:	NaCl	117,2 mM
(pH 7,3)	KCl	5,3 mM
	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1,0 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,81 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,8 mM
	Glucose x H ₂ O	5,6 mM

Erfindungsgemäß erfolgt die Vorreinigung der Hirnkapillar-Endothelzellen durch Aufschließen der Hirnsubstanz in wenigstens zwei aufeinander folgenden enzymatischen Schritten. In einem ersten enzymatischen Schritt wird die Hirnsubstanz mit dem Enzym Dispase verdaut. Der Dispaseverdau bewirkt die Auflösung des Nervengewebes. Als besonders geeignet hat sich eine Menge von 5 mg Dispase pro Gramm graue Hirnsubstanz erwiesen. Der Dispaseverdau erfolgt zweckmäßigerweise in M199-Medium, es sind jedoch auch andere Medien und Puffer für diese Reaktion geeignet. Eine entsprechend vorbereitete Dispaselösung wird zur Probe der grauen Hirnsubstanz gegeben, und die Suspension unter Rühren bei 37° inkubiert. Inkubationszeiten von zwei bis vier Stunden, vorzugsweise etwa drei Stunden, haben sich als besonders vorteilhaft erwiesen. Die Enzymkonzentrationen, die verwendeten Lösungsmittel bzw. Medien und die Inkubationsdauer sind jeweils so auszuwählen, dass möglichst viel des Materials abgebaut bzw. aufgelöst wird, welches die Hirnkapillaren umgibt bzw. bindet. Gleichzeitig sind die Bedingungen jedoch so einzustellen, dass ein möglichst geringer Teil der zu isolierenden Hirnkapillar-Endothelzellen bei dem jeweiligen enzymatischen Schritt angegriffen bzw. abgetötet wird und die Zellen einer möglichst geringen Belastung ausgesetzt werden.

Wesentlich ist hierbei, dass entstehende Scherkräfte möglichst gering gehalten werden. Dies wird beispielsweise dadurch erzielt, dass der enzymatische Verdau der Hirnmasse in Spinnerflaschen langsam und kontinuierlich gemischt wird.

- 5 Nach dem Dispaseverdau werden in einer erster Reinigungsstufe die Hirnkapillaren mittels Zentrifugation in Dextranlösung gewonnen. Hierfür können aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren eingesetzt werden. Als besonders geeignet hat sich erwiesen, eine Menge der Zellsuspension aus dem Dispaseverdau
10 mit der gleichen Menge einer 15%igen Dextranlösung zu mischen, 10 min. zu schütteln und für etwa zehn Minuten bei 10°C bei 8650 x g in einem Festwinkelrotor zu zentrifugieren. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Sediment dem zweiten enzymatischen Schritt zugeführt.
- 15 Im zweiten enzymatischen Schritt wird das Sediment der Zentrifugation mit Collagenase D verdaut. Collagenase D löst unter anderem die Basalmembran auf. Dem zweiten enzymatischen Schritt werden zweckmäßigerweise ein oder mehrere Proteaseinhibitoren zugegeben. Besonders geeignet ist hierfür der Pro-
20 teaseinhibitor Na-p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon (TLCK). Der zweite enzymatische Schritt wird zweckmäßigerweise unter Rühren bei 37°C für etwa eine Stunde durchgeführt. Es hat sich auch als besonders geeignet erwiesen, im zweiten enzymatischen Schritt eine oder mehrere DNAsen, wie Benzonase, einzusetzen.
- 25 Hierdurch wird die beim Aufschluss toter Zellen frei werdende DNA abgebaut, welche ansonsten die Viskosität der Suspension erhöht.

- Nach dem zweiten enzymatischen Schritt wird eine zweite Reinigungsstufe mittels Zentrifugation im Percoll-Dichtegradienten
30 durchgeführt. Der Dichtegradient wird vorbereitet, indem man beispielsweise 9,91 ml Percoll, 0,72 ml 10-fach konzentriertes

M199-Medium und 19,37 ml Earle's Puffer mischt und in der Ultra-Zentrifuge bei 37200 x g, 4°C im Festwinkelrotor für eine Stunde zentrifugiert. Die Zellsuspension aus dem zweiten enzymatischen Schritt wird durch mehrfaches Zentrifugieren bei geringer Geschwindigkeit, Abziehen des Überstandes und Re-suspendieren des Zentrifugationssediments gewaschen, d.h. von den zugesetzten Enzymen befreit. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Sediment in einer geringen Menge Flüssigkeit, wie z.B. 6 ml M199-Medium, aufgenommen und auf den vorbereiteten Percoll-Dichtegradienten aufgetragen und in der Ultrazentrifuge bei 1400 x g, 4°C für zehn Minuten im Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation bewirkt eine Auftrennung des suspendierten Zellmaterials nach seiner Dichte, wobei üblicherweise drei diskrete Banden auftreten. Eine erste obere Bande mit der geringsten Dichte enthält Zelltrümmer bzw. Zellfragmente. Eine zweite mittlere Bande enthält unter anderem die zu isolierenden Hirnkapillar-Endothelzellen. In einer dritten unteren Bande mit der höchsten Dichte sammeln sich unter anderem Erythrozyten.

Die zweite Bande, welche die Hirnkapillar-Endothelzellen enthält, wird isoliert und erfindungsgemäß einer weiteren Reinigung zugeführt. Die Isolierung kann durch Abziehen der Bande mit Hilfe einer Kanüle oder vorzugsweise durch Abpipetieren erfolgen.

Neben den Hirnkapillar-Endothelzellen enthält das Material der aus der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen zweiten Bande noch eine Vielzahl anderer Zelltypen, im Wesentlichen Erythrozyten und apoptotische Zellen. Bisher war es nicht möglich, diese verunreinigenden Zellen in ausreichendem Maße von den Hirnkapillar-Endothelzellen unter schonenden Bedingungen zu trennen. Überraschenderweise wurde nun gefun-

den, dass dieses Problem gelöst werden kann, wenn die weitere Reinigung der Hirnkapillar-Endothelzellen mit einem Lysepuffer durchgeführt wird, wie er üblicherweise zur Isolierung von Lymphozyten verwendet wird, wobei die Zusammensetzung des Lysepuffers, die Behandlungsdauer und die Behandlungstemperatur so ausgewählt sind, dass vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen vollständig zerstört werden und ein Großteil der Hirnkapillar-Endothelzellen überlebt. Die Vorteile und Eigenschaften dieses Puffers wurden vorstehend dargelegt.

Als erfindungsgemäß geeignet hat sich ein Lysepuffer erwiesen, der die folgenden Bestandteile enthält:

NaCl	30 mM	bis	50 mM
KCl	4,5 mM	bis	5,5 mM
NH ₄ Cl	80 mM	bis	100 mM
CaCl ₂	1,0 mM	bis	2,0 mM
MgCl ₂	0,6 mM	bis	0,8 mM
MgSO ₄	0,3 mM	bis	0,6 mM
NaHCO ₃	4,5 mM	bis	6,5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,2 mM	bis	0,45 mM
Na ₂ HPO ₄	0,4 mM	bis	0,65 mM
KH ₂ PO ₄	0,1 mM	bis	0,15 mM
Glucose	1,5 mM	bis	3,0 mM

Besonders geeignet ist ein Lysepuffer, der die folgende Zusammensetzung hat:

NaCl	39 mM
KCl	5,1 mM
NH ₄ Cl	88 mM
CaCl ₂	1,6 mM
MgCl ₂	0,69 mM
MgSO ₄	0,46 mM
NaHCO ₃	5,6 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
Na ₂ HPO ₄	0,53 mM
KH ₂ PO ₄	0,12 mM
Glucose	2,24 mM

Nach Zugabe des Lysepuffers wird die Suspension gemischt und mehrfach durch Zentrifugieren bei niedriger Geschwindigkeit und Resuspension in geeignetem Medium bzw. Puffer, wie M199 oder Earle's Puffer, gewaschen. Im Zentrifugat sammeln sich die gereinigten Hirnkapillar-Endothelzellen.

Die gereinigten Hirnkapillar-Endothelzellen können nun auf zwei verschiedenen Wegen weiter verarbeitet werden um die Anwesenheit BHS-spezifischer Proteine oder Fragmente davon zu identifizieren. So können zum einen über den Proteomics-Ansatz als auch über den Genomics-Ansatz jeweils unterschiedliche Proteine bzw. Fragmente davon bzw. Transkripte identifiziert und isoliert werden. Nachstehend werden beide Ansätze näher beschrieben.

Die folgenden Figuren erläutern den Gegenstand der vorliegenden Erfindung näher:

Figur 1a: Northern-Blot Analyse von Itm2A

Figur 1b: Die Expression von Itm2A in BMEC unter Ischämie

Figur 2: Expressionsmuster von Itm2A in kultivierten BMEC
(M:100 bp-Marker)

Figur 3: Expressionsmuster von S231 (M:100 bp ladder)

5 Figur 4: Expressionsmuster von ssEMP1 (M:100 bp ladder)

Figur 5: Northern-Blot Analyse hybridisiert mit S231 (A) bzw.
EMP1 (B) als Sonde

Figur 6: Western-Blot Analyse von S231

10 Figur 7: Homologie-Vergleich von humanem und murinem EMP1
sowie porcinem S231. Die Membrandomäne ist hell her-
vorgehoben, die N-Glykosilierungsstelle hellgrau.

Figur 8: Expressionsmuster von S231 in kultivierten Zellen
(M:100 bp-Marker)

15 Figur 9: Northern-Blot hybridisiert mit full-length
FLJ13448/S012 als Sonde

Figur 10: Homologie-Vergleich von humanem, murinem und porci-
nem FLJ13448/S012. Kursiv sind jeweils die Peptide
dargestellt, die als Signalpeptide dienen und ab-
gespalten werden.

20 Figur 11: Expressionsmuster von porcinem FLJ13448/S012 in
kultivierten Zellen (M:100 bp-Marker)

25 Figur 12: NSE2 Aminosäuresequenz des humanen Proteins. Durch
die fette, unterstrichene Schrift sind die im Mas-
senfingerprint identifizierten Peptide gekennzeich-
net.

Figur 13: Northern-Blot für NSE2 hybridisiert mit SEQ ID NO: 22 als Sonde

Figur 14: Expressionsmuster von NSE2 in kultivierten Zellen (M:100 bp-Marker)

5 Figur 15: Homologie-Vergleich von humanem NSE2 und NSE1. In hellem Font sind potentielle Phosphorilierungsstellen dargestellt. Unterstrichen ist eine mögliche Tyrosin-Kinase Domäne (ProSite Pattern Match PS00109), wobei der aktive Rest fett dargestellt ist.

10 Figur 16: Verteilung von PEST-Domänen in NSE2. PEST-Sequenzen sind Pro, Glu, Ser und Thr reiche Regionen in Proteinen, die für eine kurze Halbwertszeit solcher Proteine in der Zelle verantwortlich sind, indem sie die Ubiquitinilierung dieser Proteine kontrollieren.
15 Phosphorilierung bestimmter Ser oder Thr Reste in den PEST-Regionen (hell) ist für die Erkennung und Prozessierung durch den Ubiquitin-Proteasom Weg wichtig.

Figur 17: Die Expression von NSE2 in BMEC unter Ischämie

20 Figur 18: Aminosäuresequenz des humanen Proteins DRG-1 (CAB66619). Durch die fette, unterstrichene Schrift sind die im Massenfingerprint identifizierten Peptide gekennzeichnet.

25 Figur 19: Der Homologie-Vergleich von humanem und murinem DRG-1 zeigt 90 % Identität bzw. 94 % Homologie. Potentielle Phosphorilierungsstellen, eine nicht konservierte potentielle Glykosilierungsstelle und die Transmembrandomäne sind in hellem Font dargestellt. Der N-Terminus ist intrazellulär lokalisiert.

Figur 20: Expressionsmuster von DRG-1 (M:100 bp-Marker)

Figur 21: Expressionsmuster von DRG-1 in kultivierten Zellen
(M:100 bp-Marker)

Figur 22: TKA-1 Aminosäuresequenz des humanen Proteins. Durch
die fette, unterstrichene Schrift sind die im Massenfingerprint
identifizierten Peptide gekennzeichnet.

Figur 23: Northern-Blot hybridisiert mit ssTKA-1.ctg als Sonde

Figur 24: Expressionsmuster von TKA-1 in kultivierten Zellen
(M:100 bp-Marker)

Figur 25: Die Expression von TKA-1 in BMEC unter Ischämie

Figur 26: Western-Blot Analyse von TKA-1

Figur 27: Expressionsmuster von S064

Figur 28: Expressionsmuster von ARL8

Figur 29: Multiple-Tissue-Blot hybridisiert mit S064 als Sonde

Figur 30: Expression von S064/ARL8 in kultivierten BMEC

Figur 31: Expressionsmuster von 5G9

Figur 32: Homologievergleich zwischen HSN0V1 und PNOV1

Figur 33: Vorhersage von Transmembrandomänen innerhalb der
Sequenz des Proteins HSN0V1

Figur 34: Multiple-Tissue-Blot hybridisiert mit 5E7 als Sonde

Figur 35: Expressionsmuster von TSC-22 in kultivierten BMEC

Figur 36: Verringerte Expressionsrate von TSC-22 in BMEC bei
Ischämie

Identifizierung BHS-spezifischer Proteine durch differentielle 2D-Gelelektrophorese

Durch den direkten zweidimensionalen Vergleich der Genprodukte kann ein vollständiges Bild der Hirnkapillar-Endothelzellen erhalten werden. Erfindungsgemäß wird bei allen Elektrophore-
5 sen ein Vergleichsgewebe verwendet. Das Vergleichsgewebe ist ein Gewebe, das eine gezielte Identifikation von Transkripten bzw. Proteinen erlaubt, die spezifisch für die Blut-Hirn-Schranke sind. Grundsätzlich können beliebige Endothelzellen
10 als Vergleichsgewebe verwendet werden, beispielsweise makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen des gleichen Gewebes oder auch Endothelzellen aus anderen Organen, z.B. Herz, Lunge, Niere, Leber, Aorta etc. Es können auch aus Kultur gewonnene dedifferenzierte BMEC verwendet werden. Es ist jedoch bevor-
15 zugt, einen anderen Endothelzelltyp als Vergleichsgewebe gegen Hirnkapillar-Endothelzellen zu verwenden. Bevorzugt werden Endothelzellen aus Aorta verwendet, die keine Barrierefunktion aufweisen. Dies hat zusätzlich den Vorteil, dass Mikrogefäße gegen Makrogefäße verglichen werden können. Es können ferner
20 auch andere mikrovaskuläre Endothelzellen benutzt werden. Ebenfalls geeignet sind unter anderen Bedingungen kultivierte Hirnkapillar-Endothelzellen als Vergleichsgewebe, z.B. unter anderen Bedingungen bzgl. pH-Wert, Wachstumsmatrix, Wachstumsfaktoren, z.B. Cytokine. Aus den bekannten Eigenschaften der
25 Hirnkapillar-Endothelzellen gegenüber dem jeweiligen Vergleichsgewebe ergibt sich die physiologische Bedeutung der identifizierten Proteine. Erfindungsgemäß bevorzugt werden zwei definierte Zelltypen verwendet: Frisch isolierte BMEC als der Zelltyp mit Schrankenfunktion und Endothelzellen aus
30 Aorta, die also wie BMEC auch Endothelzellen sind, jedoch keine Schrankenfunktion aufweisen. Insbesondere durch die

Verwendung von Schweinegewebe ist es erstmals möglich eine so detaillierte Proteomkarte dieser Zellen zu erstellen.

Probenvorbereitung

Zunächst ist die Vitalität der präparierten Zellen und der Anteil der in der Präparation enthaltenen Erythrozyten zu bestimmen. Zur Bestimmung der Vitalität werden 20 µl der suspendierten Zellen entnommen und mit 4 µl Fluorescindiaceetat-Arbeitslösung (24 µM in Earle's Puffer) und 2 µl Propidium-iodid-Arbeitslösung (70 µM in Earle's Puffer) versetzt. Die Suspension wird gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden unter einem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und das Verhältnis vitale zu geschädigten Zellen bestimmt.

Lebende Zellen sind an einer grünen Fluoreszenz (Exitation 450 nm und Emission 515 nm), geschädigte Zellen dagegen an einer roten im Kern lokalisierten Fluoreszenz (Exitation 488 nm und Emission 615 nm) zu erkennen. Der Anteil der Erythrozyten wird durch Zugabe von 20 µl Benzidin-Arbeitslösung (15 mM Benzidinhydrochlorid, 12 % (v/v) Essigsäure, 2 % (v/v) H₂O₂) zu 20 µl Zellsuspension bestimmt. Die Probe wird gemischt und 5 min bei 25°C inkubiert. Danach wurde ein Tropfen der Zellen auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt.

Erythrozyten erscheinen in diesem Test durch die Anlagerung blauer Kristalle im Durchlichtmikroskop. Durch Auszählen wird das Verhältnis von Endothelzellen zu Erythrozyten bestimmt.

Die Zellen lassen sich bei einem Vitalitätsverhältnis von 95 % vitaler Zellen und bei einer Erythrozytenverunreinigung von unter 10 % für die nachfolgende zweidimensionale Gelelektrophorese verwenden.

Das Feuchtgewicht der frisch isolierten, sedimentierten Zellen wird bestimmt und mit dem fünffachen Volumen (z.B. 100 mg Zellen mit 500 µl Puffer) Puffer A pH 6.8 (10 mM PIPES, 100 mM

NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM Saccharose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 150 µM Digitonin) vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach 20 min unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (480 g, 4°C, 10 min), um die Zellen zu sedimentieren. Der Überstand wird
5 abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Das Sediment wird dann wiederum im fünffachen Volumen des ursprünglichen Feuchtgewichtes in Puffer B pH 7.4 (10 mM PIPES, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM Saccharose, 5 mM EDTA,
10 1 mM PMSF, 0,5% (v/v) Triton X-100) resuspendiert und auf Eis 30 min unter heftigem Schütteln inkubiert. Danach wird die Probe 10 min durch Zentrifugation (5000 g, 4°C) sedimentiert, der Überstand abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

15 Das Sediment wird nun im 1,7fachen des ursprünglichen Feuchtgewichtes in Puffer C pH 7.4 (10 mM PIPES, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1% (v/v) TWEEN-40, 0,5% (w/v) Desoxycholat) resuspendiert, in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit fünf Hüben aufgeschlossen. Danach wird die Probe wieder in ein
20 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Probe wird dann durch Zentrifugation (6780g, 4°C, 10 min) sedimentiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Das Sediment ist je nach Größe in 200 - 500 µl Puffer D pH 8.0
25 (50 mM Tris, 1 mM MgCl₂) zu resuspendieren und wird in Stickstoff schockgefroren. Danach wird die Probe im Ultraschallbad aufgetaut und anschließend bei 37°C mit 5 - 10 µl Benzonase (25 U/µl) inkubiert bis sich eine homogene, nicht mehr viskose Flüssigkeit bildet. Dann wird das 7fache Volumen einer 5 %
30 (w/v) SDS-Lösung zugegeben und die Probe 20 min auf 90°C erhitzt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min (7000g, 20°C)

zur Entfernung unlöslicher Bestandteile. Der Überstand wurde abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das eventuell vorhandene Sediment wird verworfen.

Die Überstände werden aufgetaut, anteilmäßig vereinigt und
5 gemischt. Um die in der Probe enthaltenen Detergenzien zu entfernen, erfolgt die Mischung der Probe mit 100 % Aceton (gelagert bei -30°C) im Verhältnis 20 zu 80. Nach gründlichem Mischen wird die Fällung mindestens 1 h bei -30°C inkubiert. Danach erfolgt die Sedimentierung der gefällten Proteine für
10 15 min bei 10.000g und 4°C . Der Überstand wird dekantiert und verworfen.

Anschließend wird das Sediment mit 80 % (v/v) Aceton (-30°C kalt) gewaschen und erneut bei -30°C inkubiert. Nach der erneuten Zentrifugation (15 min, 10.000 g, 4°C) wird der
15 Überstand verworfen und das Sediment in der kleinstmöglichen Menge Solubilisierungspuffer I (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS) oder II (8 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS) resuspendiert und der Proteingehalt der Proben bestimmt. Dazu werden für die Proteinbestimmung in einem 50 ml
20 Reaktionsgefäß 1 Teil Rotiquant (Roth) und 4 Teile bidestilliertes Wasser zu einer fertigen Arbeitslösung gemischt und unlösliche Bestandteile über einen Faltenfilter entfernt. Für die Eichgerade werden Verdünnungen von Rinderserumalbumin (BSA) in Solubilisierungspuffer I bzw. II hergestellt. Dabei
25 wurden für die Eichlösungen Konzentrationen von 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,0 mg/ml eingestellt. Von den Eichlösungen, der Probe und der Referenz (Solubilisierungspuffer I oder II) werden je 20 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 1 ml der Rotiquant-Arbeitslösung versetzt.
30 Gemischt wird in dem jeweiligen Reaktionsgefäß durch sofortiges Invertieren, danach erfolgt eine Inkubation der Probe bei 25°C für die Dauer von 20 min. Nach Überführen der Probe in

eine 1 ml Küvette wird in einem Spektralphotometer bei 560 nm die Absorption gemessen. Durch Erstellung einer Eichgerade kann der Proteingehalt der Proben bestimmt werden.

Die restlichen Überstände der Proben werden dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Isoelektrische Fokussierung

Für 12 Fokussierungsgele werden 2,5 mg Probe, die in 4,5 ml Solubilisierungspuffer I oder II (für pH-Gradient 4,5-5,5) gelöst vorliegen, mit 1,125 ml Fokussierungspuffer I (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 91 mM DTT, 2,5 % IPG-Puffer) bzw. II (8 M Harnstoff, 4% (w/v) CHAPS, 91 mM, 2,5% IPG-Puffer; für pH-Gradient 4,5-5,5) versetzt, 1 min im Ultraschallbad behandelt und dann 5 min in der Tischzentrifuge (20.000g) zentrifugiert. Für die verwendeten pH-Gradienten (3,5 - 4,5; 4,0 - 5,0; 4,5 - 5,5; 5,0 - 6,0; 5,5 - 6,7; 6,0 - 9,0) die als 24 cm lange Gele (Immobiline DryStrip; Amersham Biosciences) eingesetzt werden, werden die passenden IPG-Puffer eingesetzt.

Anschließend werden je 450 µl Probe in die Rehydratisierungsvorrichtung pipettiert und das Immobililine DryStrip-Fokussierungsgel mit Hilfe von zwei Pinzetten mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf die Lösung gelegt. Danach wird das Gel mit Paraffinöl überschichtet. Die Rehydratisierungsdauer beträgt mindestens 12 h bis maximal 16 h. Beim pH-Gradienten 6,0 - 9,0, bei dem die Probe mittels Cup-Loading aufgetragen wird, wird anstelle der Probe mit der entsprechenden Mischung aus Solubilisierungspuffer I (4,5 ml) mit dem entsprechenden Fokussierungspuffer I (1,125 ml) der Gelstreifen rehydratisiert. Nach der Rehydratisierung wird jeder Gelstreifen in einen 24 cm Stripholder überführt und in Falle des „Cup Loadings“ zusätzlich der Sample Cup direkt vor die

Kathode platziert. Die Probe mit jeweils 200 µg Protein wird in den Sample Cup pipettiert und zusammen mit dem Immobiline DryStrip-Gel mit Paraffinöl überschichtet.

Die mit bidestilliertem Wasser angefeuchteten Elektrodenstreifen werden an den jeweiligen Gelen positioniert. Auf diese Streifen werden dann die Elektroden aufgesetzt. Danach werden jeweils 6 beladene Stripholder in einer ETTAN IPGphor Fokussierungsapparatur (Amersham Biosciences) mit einem, dem pH-Gradienten entsprechenden Programm (siehe Tabelle 1) fokussiert. Nach Abschluss der Fokussierung werden die Streifen mit einer Pinzette entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 1: Programme für die Isoelektrische Fokussierung

Programm 1			
S1	500 V	Linearer Gradient	1 h
S2	500 V	Stufengradient	1 h
S3	1000 V	Stufengradient	1 h
S4	8000 V	Linearer Gradient	1 h
S5	8000 V	Stufengradient	88 kWh
Programm 2			
S1	500 V	Linearer Gradient	0,5 h
S2	500 V	Stufengradient	0,5 h
S3	1000 V	Linearer Gradient	0,5 h
S4	1000 V	Stufengradient	0,5 h

S5	4000 V	Linearer Gradient	1,0 h
S6	4000 V	Stufengradient	0,5 h
S7	8000 V	Linearer Gradient	0,5 h
S8	8000 V	Stufengradient	105 kWh

Programm 1 wird für die pH-Gradienten 3,5 - 4,5, 4,0 - 5,0, 4,5 - 5,5, 5,0 - 6,0 und 5,5 - 6,7 angewandt, während Programm 2 bei Gelen mit einem pH-Gradienten von 6,0 - 9,0 zur Anwendung kommt.

SDS-Gelelektrophorese

Für die zweite Dimension werden die benötigten SDS-Polyacrylamidgele mit einer Konzentration an Acrylamid von 12,5 % (w/v) selbst hergestellt.

- 10 Die Gelgießapparatur wird entsprechend der Bedienungsanleitung (Amersham Biosciences) montiert und mit Verdrängungspuffer pH 8,8 (0,375 M Tris, 50 % (v/v) Glycerin, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) in das vorgesehene Reservoir befüllt.

Der Gelpolymerisationsansatz pH 8,8 (12,17 % (w/v) Acrylamid, 15 0,33 % (w/v) Bisacrylamid, 0,375 M Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat) wird in ein Gefäß mit Auslauf-tülle gemischt und dann 5 min im Ultraschallbad entgast.

Danach wird die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von 0,04 % (v/v) TEMED gestartet. Sofort wird das Gefäß an einem Stativ 20 montiert und über einen Schlauch mit der Gelgießapparatur verbunden. Die Gellösung wird in die Apparatur fließen lassen bis sie ca 3 cm unter der niedrigeren Kante der Gel-Kassetten steht. Danach wird der Stopfen des Reservoirs für den Verdrän-

gungspuffer gelöst und der Puffer verdrängt die Gellösung, bis diese ca 1 cm unter die Glaskante der Kasette gestiegen ist. Die gegossenen Gele werden bis zur vollständigen Polymerisation mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet.

- 5 Je ein Fokussierungsgel wird aus dem - 80°C-Gefrierschrank entnommen und in ein Equilibrierungsröhrchen überführt. Durch Zugabe von je 15 ml Reduktionspuffer pH 8.8 (6 M Harnstoff, 50 mM Tris, 30% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 65 mM DTT) werden die in den Gelen fokussierten Proteine unter Schütteln für 15
- 10 min bei 25°C reduziert. Danach wird der Reduktionspuffer verworfen und die Proteine durch Zugabe von 15 ml Alkylierungspuffer (6 M Harnstoff, 50 mM Tris, 30% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 260 mM Iodacetamid) mit Iodacetamid alkyliert. Die Inkubation erfolgt dabei ebenfalls für 15 min bei 25°C unter
- 15 Schütteln. Der Puffer wird anschließend auch verworfen und der Gelstreifen wird aus dem Röhrchen entnommen. Mit Hilfe einer Pinzette wird das Gel auf die SDS-Gele gelegt und mit 2 ml flüssiger Agaroselösung pH 8,3 (0,5 % (w/v) Agarose, 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) überschichtet und dadurch
- 20 fixiert. Die Elektrophoresekammer ETTAN DALT II (Amersham Biosciences) wird mit 10 l 2D-Laufpuffer pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) befüllt, die PAA-Gele in das Gerät eingebaut und der Elektrophoreselauf durchgeführt. Dabei wird zunächst eine konstante Leistung von 5 W pro PAA-Gel für
- 25 50 min eingestellt. Die Temperatur beträgt konstant 20°C. Danach wird die Leistung auf 55 W pro Gel maximal jedoch auf 180 W erhöht und die Elektrophorese fortgesetzt bis der blaue Kontrollfarbstoff (Bromphenolblau) das untere Ende der Gele erreicht hat. Die Elektrophorese wird beendet und die Gele
- 30 entnommen. Je Gel werden in einer Schale 400 ml (7 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Methanol) vorgelegt, das Gel aus den Glasplatten entnommen und in die Schalen überführt. Zur Fixie-

rung werden die Gele 30 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Währendessen werden 400 ml SyproRuby Färbelösung in einer schwarzen Schale vorgelegt und die fixierten Gele nach Ablauf der Inkubationszeit in die Färbelösung überführt. Nach der Färbung für 16 h unter Schütteln werden die Gele in 400 ml Fixierung 15 min entfärbt und zur Dokumentation im FLA 5000 Scanner (Fuji) bei einer Anregungswellenlänge von 473 nm und einer Emissionswellenlänge von 575 nm bei einer Auflösung von 100 µm und einer 16 bit Gradation gescannt. Die Gele werden danach in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Identifikation differentieller Spots

Zur Identifikation differentieller Proteinspots wurden zunächst pro pH-Gradient (3,5 - 4,5; 4,0 - 5,0; 4,5 - 5,5; 5,0 - 6,0; 5,5 - 6,7; 6,0 - 9,0) jeweils 10 Gele mit frisch präparierten BMECs und 10 Gele aus AOECs (Aorta Endothelial Cells) erstellt und gescannt. Die Gele wurden dann mit Z3-Auswertesoftware (Compugen) verglichen und differentielle Spots annotiert. Als Filter wurden dabei eine minimale Spotgröße von 100 Pixel angenommen. Die Proteinspots, die in BMECs höher (dreifache Menge oder mehr) oder einzigartig detektiert werden konnten, wurden mit einer 1000 µl-Spitze auf einem Blaulichttisch (MoBiTec) ausgestochen und in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die ausgestochenen Spots wurden beschriftet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Hydrolyse und massenspektrometrische Analyse der Proteinproben

Das in der Gelmatrix fixierte, ausgestochene Protein wurde aus dem -80°C Kühlschrank entnommen und durch Zugabe von 100 µl bidestilliertem Wasser gewaschen. Dazu wurde der jeweilige Ansatz 20 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert und dann der Überstand abpipettiert und verworfen. Der Vorgang wurde noch

zwei weitere Male wiederholt. Daran wurde zweimal mit 100 µl 50% (v/v) Acetonitril überschichtet und jeweils 15 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Erneut wurden die Überstände verworfen. Durch die Zugabe von 100 µl 100% Acetonitril und 15 minütiger Inkubation bei 25°C unter Schütteln erfolgte eine vollständige Dehydratisierung des Gelstückes. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Gelstück 5 min an der Luft getrocknet. Danach wurde das Gelstück in 15 µl Hydrolysepuffer (50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 25 ng - 50 ng/15 µl Trypsin V) wieder rehydratisiert und gequollen. Die Hydrolyse der Proteine erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 18 h. Für die Erstellung eines Peptid-„Fingerprints“ mittels Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) werden die Hydrolysen mit 15 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure angesäuert. Die verwendeten ZipTip-C18-Pipettenspitzen werden durch dreimaliges Rehydratisieren mit je 10 µl 50% (v/v) Acetonitril und anschließendes dreimaliges Equilibrieren mit je 10 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure vorbereitet. Das Auftragen der Probe erfolgt durch sieben- bis zehnmaliges Aufziehen des Überstandes des Hydrolyseansatzes. Gewaschen werden die ZipTips dann mit 10 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure. Die Peptide werden direkt mit der Matrix (α -Cyanozimtsäure, 50% (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure) durch drei- bis viermaliges Auf- und Abpipettieren auf den MALDI-Messträger eluiert. Nach Trocknen der Proben auf dem Träger werden die Proben zunächst massenspektrometrisch mittels MALDI-Fingerprint gemessen und analysiert. Dazu werden am Voyager DE PRO (PerSeptive Biosystems) MALDI-Massenspektrometer die Proben im „Positive Reflector Mode“ mit einer Beschleunigungsspannung von 20000 V, einer Gitterspannung von 75%, einem Weichendraht von 0,02% und einer Verzögerungszeit von 220 ns gemessen. Dabei wird ein Massenfenster verwendet, das Massen zwischen 700 - 3500 Da berücksichtigt.

Die erhaltenen Massenlisten für jeden Proteinspot werden in eine Datenabfrage eingesetzt. Verwendet werden dabei drei verschiedene Programme: Mascot, MSFit und Profound.

Proteinspots, bei denen trotz eines guten Massen-Fingerprints
5 keine Datenbank-Identifizierung möglich ist, werden mit ESI-Massenspektrometrie zur Generierung von Aminosäuresequenzinformation eingesetzt.

Nach der Hydrolyse wird der Hydrolyseansatz dafür mit 15 µl 0,2% (v/v) Ameisensäure angesäuert und 30 min unter Schütteln
10 inkubiert. ZipTip-C18-Pipettenspitzen (MilliPore) werden währenddessen dreimal mit je 10 µl 50% (v/v) Acetonitril rehydratisiert und anschließend durch dreimal Waschen mit je 10 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure equilibriert. Das Auftragen der Probe erfolgt durch sieben- bis zehnmaliges Aufziehen
15 des Überstandes des Hydrolyseansatzes. Gewaschen werden die ZipTips dann mit 10 µl 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure, anschließend wird durch zweimaliges Waschen mit 0,1% (v/v) Ameisensäure umgepuffert und dann die Peptide durch fünf- bis siebenmaliges Aufziehen von 2 µl 50% (v/v) Methanol eluiert.

20 Die erhaltenen Peptidgemische können entweder direkt oder mittels Liquid-Chromatographie (LC) gekoppelt mit ESI-Massenspektrometrie analysiert werden.

Für eine Direktmessung wird 1 µl der eluierten Probe in eine Hohl-
nadel (Protana) gefüllt. Dabei wird zunächst ein Über-
25 sichtsspektrum mit einer Ionensprayspannung von 850 - 1000 V, einem Vorhanggasdruck von 20 psi, einem „Declustering“-Potential von 40 - 50 V, einem Fokussierungspotential von 245 V und der Spannung an der Mehrkanalplatte von 2000 - 2100 V im „Positive Mode“ gemessen. Der Scanbereich liegt dabei bei 100
30 - 1600 oder 410 - 1600 Th. Die im Spektrum detektierten Peptide werden einer stoßinduzierten Fragmentierung unterworfen.

Dazu werden Produktionenspektren von jedem Peptid bei einer Ionensprayspannung von 850 - 1000 V, einem Vorhanggasdruck von 20 - 40 psi, einem „Declustering“-Potential von 40 - 50 V, einem Fokussierungspotential von 245 V, einer Quadrupolauflösung 0,7 - 1,0 amu, einer Kollisionenergie von 15 - 50 V und einer Spannung an der Mehrkanalplatte von 2100 - 2400 V aufgenommen. Der Scanbereich beträgt dabei 50 - 1600 Th.

Bei der Kopplung der nanoHPLC an das ESI-Massenspektrometer wird zunächst die Reversed phase(RP)-Vorsäule mit 2 µl Probe bei einem Fluss von 20 µl/min 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure beladen. Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgt über eine RP-C18-Säule (LC Packings) mit einem Gradienten über 35 min von den Anfangsbedingungen (0,05 % (v/v) Ameisensäure, 10 % (v/v) Acetonitril) bis zu den Endbedingungen (0,05 % (v/v) Ameisensäure, 76 % (v/v) Acetonitril). Die Kopplung der HPLC mit dem Massenspektrometer erfolgt über eine Hohlneedle (New Objective). Die Einstellungen des Massenspektrometers werden so gewählt, dass während des LC-Laufes zwei Experimente durchgeführt werden können. Außer der Ionensprayspannung (1800 - 2200 V) entsprechen die dabei eingestellten Parameter den bereits oben aufgeführten. Es werden sowohl Übersichtsspektren als auch Produktionenspektren abwechselnd während des Laufes aufgenommen. Die Einstellungen sind bei den Produktionenspektren so gewählt, dass die beiden intensivsten Signale des Übersichtsspektrums, die 2fach, 3fach oder 4fach geladen und deren Intensität größer als 10 cps sind, anschließend über eine stoßinduzierte Fragmentierung analysiert werden. Der Scanbereich liegt dabei von 450 - 1600 Th. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgt in drei Stufen:

A) Die Produktionenspektren, die Informationen über die Aminosäuresequenz des korrespondierenden Peptides enthalten, werden zunächst mit Hilfe des Softwareprogrammes MASCOT (Mat-

rix Sciences) vollständig mit öffentlichen Datenbanken abgeglichen. Kann dabei keine Zuordnung des Peptides zu einem Protein erfolgen, werden

5 B) die Produktionenspektren mit einem Softwaretool des Geräteherstellers zunächst automatisch sequenziert. Die so erhaltenen Aminosäuresequenzen wurden nach Shevchenko et al. über MSBlast mit den öffentlichen Datenbanken verglichen. Konnte das Protein nicht identifiziert werden, wurden

10 C) die Produktionenspektren manuell ausgewertet und die erhaltenen Aminosäuresequenzen mittels Blast oder FASTA mit den öffentlichen Datenbanken verglichen.

Nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren können gezielt BHS-spezifische Proteine oder auch Fragmente davon in Hirnkapillar-Endothelzellen identifiziert werden. Die vorstehende
15 Beschreibung erlaubt natürlich Routinevariationen, die einem Fachmann offensichtlich sind. Beispielsweise können folgende Verfahrensschritte variiert werden:

- Als Aufschlussverfahren können auch andere dem Fachmann bekannte Verfahren zur Gewinnung der Proteine verwendet
20 werden, die in der Standardliteratur beschrieben sind (z.B. „2D-Proteome Analysis Protocols“)
- Für die isoelektrische Fokussierung können natürlich entsprechende Fokussierungsgele von anderen Herstellern eingesetzt werden. Auch verschiedene Längen und pH-
25 Gradienten können eingesetzt werden.
- Für die Trennung in der zweiten Dimension können natürlich entsprechende Gelsysteme anderer Hersteller verwendet werden. Auch ist die Verwendung weiterer Gelgrößen möglich.

- Standardmäßig können auch andere dem Fachmann bekannte Proteasen zur Herstellung des Peptidmusters verwendet werden.
- Zur Bestimmung der Peptidmassen und de novo Aminosäuresequenzen können auch Massenspektrometer anderer Bauart und anderer Hersteller verwendet werden.
- Zur Bestimmung der Peptidmassen und der de novo Aminosäuresequenzierung können die massenspektrometrischen Bedingungen sowohl apparativ als auch funktionell entsprechend der Probe variiert werden.

Western-Blot der Proteine

Zunächst wurden die Proteine wie vorstehend beschrieben auf 12,5%igen Polyacrylamidgelen getrennt und anschließend auf Nitrocellulosemembran übertragen.

- 15 Dazu wurden sieben Whatman-Papiere (Schleicher & Schüll) auf Trenngelgröße zugeschnitten und jeweils mit verschiedenen Puffern getränkt.

- Zwei Papiere in Anodenpuffer I (300 mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol) wurden luftblasenfrei auf die Anoden der Blot-Apparatur (BioRad) gelegt, danach folgten zwei Papiere in Anodenpuffer II (25 mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol). Die ebenfalls in Anodenpuffer II getränkte Nitrocellulosemembran wurde aufgelegt, dann folgte das Polyacrylamidgel. Abschließend wurden noch drei Papiere in Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM Aminocaprinsäure, 0,1% (w/v) SDS, 20% Methanol) getränkt und aufgelegt. Die Apparatur wurde geschlossen und der Transfer der Proteine erfolgte für eine Stunde bei maximal 25 V und 2,5 mA/cm² Gel.

Danach erfolgte eine immunchemische Färbung der Proteine mit polyklonalen Antiseren aus Kaninchen.

Dazu wurden die Membranen in TBST-Puffer (10 mM Tris-Base, 150 mM Natriumchlorid, 0,05% (v/v) Tween 20; pH 8,0) gewaschen und anschließend 30 min mit Blotto (10 mM Tris-Base, 150 mM Natriumchlorid, 0,05% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) Magermilchpulver; pH 8,0) freie Bindungsplätze abgesättigt. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte für 2 h bei RT in TBST-Puffer [Anti-EMP1-Antikörper (Kaninchen) 1:4000; Anti-TKA-1-Antikörper (Kaninchen) 1:4000], danach wurde dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch Inkubation mit einem mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Zweitantikörper 1 h bei RT in TBST-Puffer [Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Ziege) 1:5000]. Nach zweimaligem Waschen mit TBST-Puffer, wurde die Membran durch Inkubation mit AP-Puffer (100 mM Tris-Base, 100 mM Natriumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid; pH 9,5) auf einen alkalischen pH-Wert umgepuffert. Als Substrate für die Farbreaktion wurden 0,016% (w/v) Nitrotetrazolium-Blue-chlorid und 0,033% (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Dinatriumsalz in AP-Puffer verwendet.

Im Folgenden wird nun die Identifizierung BHS-spezifischer Proteine oder Fragmente davon in Hirnkapillar-Endothelzellen über den Genomics-Ansatz beschrieben.

Identifizierung BHS-spezifischer Transkripte durch cDNA-Subtraktion

Die gezielte Identifizierung zell- oder gewebespezifischer Proteine erfolgt durch differentielle Verfahren. Dies kann auf Proteinebene durch den Vergleich von 2D-Gelen von Aufschlüssen verschiedener Gewebe bzw. Zellen und durch anschließende Ermittlung der für ein Gewebe bzw. einen Zelltyp spezifischen Proteine erfolgen. Um von den physikalischen Eigenschaften von

Proteinen (Größe, Löslichkeit) unabhängig zu sein, können zur Identifizierung spezifischer Proteine auch differentielle Verfahren auf Transkriptebeine durchgeführt werden. Solche subtraktiven RNA-Techniken haben zusätzlich den Vorteil, weniger Gewebe bzw. Zellmaterial zu benötigen.

Zur Identifizierung BHS-spezifischer Proteine ist die Verwendung frisch isolierter BMEC als Ausgangsmaterial entscheidend. Bisher beschriebene Verfahren beruhten bestenfalls auf der Subtraktion von RNA aus Hirnkapillaren gegen RNA aus Niere (Li et al., 2001). Problematisch hierbei ist, dass Hirnkapillaren neben BMEC auch andere Zelltypen, wie Perizyten und Astrozyten, enthalten. Weiterhin ist das Subtraktionsgewebe Niere sehr heterogen, da es aus verschiedenen Zelltypen besteht, von denen Endothelzellen nur einen kleinen Teil ausmachen. Erfindungsgemäß ist ein Subtraktionsgewebe zu verwenden, das eine gezielte Identifikation von Transkripten bzw. Proteinen erlaubt, die spezifisch für die Blut-Hirn-Schranke sind. Grundsätzlich können beliebige Endothelzellen als Vergleichsgewebe verwendet werden, beispielsweise makro- und microvaskuläre Endothelzellen des gleichen Gewebes oder auch Endothelzellen aus anderen Organen, z.B. Herz, Lunge, Niere, Leber, Aorta etc. Es können auch aus Kultur gewonnene dedifferenzierte BMEC verwendet werden. Es ist jedoch bevorzugt ein anderer Endothelzelltyp als Vergleichsgewebe gegen Hirnkapillar-Endothelzellen zu verwenden. Bevorzugt werden Endothelzellen aus Aorta verwendet, die keine Barrierefunktion aufweisen. Dies hat zusätzlich den Vorteil, dass Mikrogefäße gegen Makrogefäße verglichen werden können. Es können ferner auch andere mikrovasculäre Endothelzellen benutzt werden. Ebenfalls geeignet sind unter anderen Bedingungen kultivierte Hirnkapillar-Endothelzellen als Vergleichsgewebe, z.B. unter anderen Bedingungen bzgl. pH-Wert, Wachstumsmatrix, Wachstumsfaktoren (z.B.

Zytokine etc.). Aus den bekannten Eigenschaften der Hirnkapillar-Endothelzellen gegenüber den jeweiligen Vergleichsgewebe ergibt sich die physiologische Bedeutung der identifizierten Targets. Erfindungsgemäß bevorzugt werden zwei definierte Zelltypen verwendet: Frisch isolierte BMEC als der Zelltyp mit Schrankenfunktion und Endothelzellen aus Aorta, die also wie BMEC auch Endothelzellen sind, jedoch keine Schrankenfunktion aufweisen. Dieser Ansatz erlaubt viel gezielter Transkripte bzw. Proteine zu identifizieren, die zur Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beitragen.

Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank

Gesamt-RNA wird aus den Zellen mit *Trizol* (Invitrogen) nach den Herstellerangaben isoliert. Die Gesamt-RNA wird anschließend auf einem denaturierenden Agarosegel auf ihre Intaktheit überprüft. Zur RNA-Isolierung werden 100 mg Gewebe bzw. 10 cm² konfluent gewachsene Zellen in je 1 ml *Trizol* mechanisch homogenisiert und das Homogenat anschließend 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 0,2 ml Chloroform / 1 ml *Trizol* (Invitrogen) gegeben, 15 sec durch vortexen gemischt and 3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wird 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert und im Anschluss daran die obere, wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt. Hierzu wird 0,5 ml Isopropanol / 1 ml *Trizol* gegeben, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wird durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 x g sedimentiert, zweimal mit 75 % EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Konzentration wird spektralphotometrisch bestimmt und die Qualität in einem denaturierenden Agarosegel überprüft.

Ausgehend von Gesamt-RNA wird die mRNA mit Hilfe von *Dynabeads* (Dynal) nach den Herstellerangaben angereichert.

mRNA-Anreicherung: 75 µg Gesamt-RNA wird 2 min bei 65 °C denaturiert, sofort zu 200 µl Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (DynaI) in zweifach Bindepuffer gegeben und 5 min unter Mischen inkubiert. Der Überstand der magnetischen Separation wird verworfen und die Dynabeads zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Die polyA⁺-RNA wird schließlich mit 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 für 2 min bei 85 °C eluiert.

Die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank kann mit handelsüblichen PCR Subtraktionskits durchgeführt werden. Beispielsweise kann der *PCR-Select cDNA Subtraction Kit* der Firma Clontech nach den Herstellerangaben verwendet werden.

Hierzu werden jeweils 2 µg mRNA aus BMEC (Tester) und AOEC (Driver) ausgehend von einem Oligo(dT)-Adapterprimer mit dem Enzym AMV Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Direkt im Anschluss daran wird die Zweitstrangsynthese mit einem Enzymgemisch (DNA Polymerase I, RNase H und DNA Ligase) für zwei Stunden bei 16°C und mit anschließender Zugabe von T4 DNA Polymerase und weiterer Inkubation bei 16°C für 30 Minuten durchgeführt. Die so hergestellte doppelsträngige cDNA wird durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung gereinigt.

Zur Einführung geeigneter Enden für die spätere Adapterligation sowie zur Erzeugung einer einheitlicheren Größenverteilung der cDNA-Fragmente erfolgt nun eine Restriktion mit *Rsa* I. Die so hergestellten doppelsträngigen cDNA-Fragmente werden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung gereinigt. Die Produkte der cDNA-Synthesen sowie der Restriktionen werden gelelektrophoretisch auf Reinheit überprüft.

Für die spätere Amplifikation durch PCR werden nun die Adaptern 1 und 2R über die *Rsa* I-Enden an die Tester-cDNA mit dem

Enzym T4 DNA Ligase angehängt. Die Ligation wird mittels PCR überprüft.

Die eigentliche Subtraktion erfolgt durch zwei Hybridisierungen. Für die erste Hybridisierung wird in einem Ansatz cDNA aus BMEC-Adapter 1 mit AOEC cDNA hybridisiert, in einem anderen Ansatz cDNA aus BMEC-Adapter 2R mit AOEC cDNA. In der zweiten Hybridisierung werden die beiden Ansätze aus der ersten Hybridisierung vereinigt und mit frisch denaturierter cDNA aus AOEC hybridisiert.

- 10 Die Produkte aus der Hybridisierung werden schließlich als Matrize (Template) in eine erste PCR-Reaktion eingesetzt; als Primer dient hier ein Oligonukleotid aus dem gemeinsamen Bereich der beiden Adaptoren 1 und 2R.

Das Produktgemisch dieser ersten PCR wurde nun als Matrize in eine verschachtelte PCR (nested PCR) eingesetzt, wobei die beiden ineinander angeordneten Primer jeweils aus dem einzigartigen Bereich der beiden Adaptoren 1 und 2R stammen. Diese zweite PCR erhöht die Spezifität.

- 20 Die Effizienz der Subtraktion wurde durch vergleichende PCR an einem Haushalts-Gen (GAPDH) überprüft: Mit der cDNA aus der Subtraktion kann im Vergleich zu den beiden nicht subtrahierten cDNAs aus BMEC und AOEC erst nach signifikant mehr PCR-Zyklen eine Produktbildung erfolgen. GAPDH wird als typisches Haushaltsgen in allen Geweben und Zelltypen in vergleichbarer Stärke exprimiert. Es sollte deshalb bei einer subtraktiven Hybridisierung nicht wie differentiell exprimierte Gene angereichert werden, sondern die Transkriptmenge sollte in den subtrahierten cDNAs (sowohl forward als auch reverse subtraction) im Vergleich zu den cDNAs aus BMEC bzw. AOEC vor der Subtraktion stark abnehmen. Experimentell wird dies bestätigt, indem die beiden cDNAs vor der Subtraktion bzw. die jeweils
- 25
- 30

subtrahierten cDNAs in eine PCR mit GAPDH-spezifischen Primern eingesetzt werden. Da mit den subtrahierten cDNAs eine erste Produktbildung erst nach zusätzlichen 16 Zyklen im Vergleich zu den beiden nicht subtrahierten cDNAs erzielt wird, findet
5 folglich durch die Hybridisierung eine Anreicherung um mindestens den Faktor 50.000 statt. Diese Anreicherung ermöglicht die gezielte Identifizierung BHS-spezifischer Transkripte und stellt auch bereits eine erste Validierung der isolierten Sequenzen dar.

10 Die Produkte der zweiten PCR werden in den Vektor pT-Adv (Clontech) kloniert und in TOP10F' (Clontech) chemokompetente *E. coli* transformiert. Die Produkte der zweiten PCR werden in den Plasmid-Vektor pT-Adv (Clontech) kloniert. Dieser Vektor besitzt an den 5'Enden überstehende dT-Reste, die zu den 3'
15 dA-Resten kompatibel sind, die z.B. durch *Taq* DNA-Polymerase an PCR-Produkte angehängt werden. Dieses bzw. vergleichbare Systeme erlauben die direkte Klonierung von PCR-Produkten mit hoher Effizienz. Die Transformation erfolgt in chemokompetente *E. coli* TOP10F' (Clontech) wie in der Literatur beschrieben
20 (Sambrook et al., 1989).

Differentielle Hybridisierung

Klone aus der subtraktiven cDNA-Bank werden durch differentielle Hybridisierung bezüglich ihrer Expression BMEC vs. AOEC verifiziert. Hierzu wird das *PCR-Select Differential Screening*
25 *Kit* (Clontech) benutzt. Die *reverse subtracted probe* wurde mit dem *PCR-Select cDNA Subtraction Kit* der Firma Clontech nach Herstellerangaben wie oben beschrieben hergestellt, wobei BMEC als *Driver* und AOEC als *Tester* dient.

Entsprechend den Herstellerangaben werden in Mikrotiterplatten
30 mit 96 Kavitäten Flüssigkulturen der Klone angeimpft. Diese werden als Template zur Amplifizierung der Insertionen mit den

Primern Adaptor 1 und 2R eingesetzt. Der Rest der Flüssigkulturen wird mit Glycerin versetzt und als Dauerkultur eingefroren. Die PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch überprüft. Von Produkten, die größer als 200 bp waren, wird jeweils 1 µl auf zwei identische HybondN-Membranen gespottet und auf diesen mit UV-Licht fixiert. Abweichend von den Herstellerangaben werden jeweils nur zwei Filter à 92 Klone hybridisiert: ein Filter mit der *forward subtracted probe*, in der BMEC-spezifische Transkripte angereichert sind, und der andere Filter mit der *reverse subtracted probe*, in der AOEC-spezifische Transkripte angereichert sind. Auf die Hybridisierung zweier weiterer Filter mit cDNA aus BMEC bzw. AOEC wurde verzichtet, da hieraus keine relevante Zusatzinformation zu entnehmen ist. Statt dessen wird RNA aus BMEC und AOEC bei der späteren Verifizierung in Northern-Blot-Analysen bzw. RT-PCR-Experimenten zur Erstellung von Expressionsmustern eingesetzt. Pro Filter werden PCR-Produkte von 92 Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank sowie zwei Negativkontrollen des Herstellers aufgetragen. Zusätzlich zu den Herstellerangaben wird je ein PCR-Produkt eines Haushaltsgens gespottet, das in BMEC und AOEC gleich stark exprimiert wird, sowie als Positivkontrolle ein PCR-Produkt zu einem BHS-Marker (Apolipoprotein A1), der in BMEC stärker exprimiert ist als in AOEC.

Die Hybridisierungen werden wie vom Hersteller beschrieben mit Sonden gleicher Aktivität bei 72°C mit „ExpressHyb“-Lösung (Clontech) durchgeführt und die Filter anschließend stringent gewaschen. Es können übliche Bedingungen der Stringenz verwendet werden. Günstigerweise werden die Filter 2 x 20 min bei 68°C bis zu einer Stringenz von 0,2 x SSC/0,5% SDS gewaschen. Die Signalintensitäten werden durch Expositionen verschiedener Zeitdauer auf einem Film mit Hilfe eines Phosphoimagers (FLA-5000, Fuji) ermittelt. Klone, die ein ca. fünfmal stärkeres

Signal in BMEC als in AOEC zeigten, werden als differentiell exprimiert eingestuft und weiterverarbeitet.

Von positiven Klonen werden aus der Dauerkultur Flüssigkulturen angeimpft und die Plasmid-DNA nach Standardmethoden (Birnbom und Doly, 1979) mit Hilfe von Qiagen-Säulen isoliert. Die Insertionen der Plasmide werden mit Universalprimern und gegebenenfalls zusätzlichen genspezifischen Primern sequenziert. Datenbanken werden mit den erhaltenen DNA-Sequenzen mit Hilfe der Algorithmen BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) und FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>) auf Homologien durchsucht.

Weitere Verifizierung BHS-spezifischer Transkripte: Expressionsmuster

Von den interessierenden positiven Klonen werden Expressionsmuster in BMEC, AOEC und neun weiteren Geweben erstellt. Dies erfolgt durch RT-PCR und/oder Northern-Blot-Analysen.

Für RT-PCR Experimente werden cDNAs ausgehend von Gesamt-RNA durch *random priming* hergestellt. Alle benutzten Enzyme sowie die *random* Hexamere stammen von Invitrogen. Hierzu werden jeweils 10 µg Gesamt-RNA in 40 µl Nuklease-freiem Wasser mit 5 µl DNase I 10x Puffer sowie 5 µl DNase I versetzt und 15 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend werden 5 µl 25 mM EDTA zugegeben und das Enzym für 15 Minuten bei 65°C hitzedesaktiviert. Von dem Ansatz werden 25 µl entnommen, mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und als -RT Kontrolle bei -80°C gelagert. Zu den restlichen 25 µl Gesamt-RNA aus dem DNase I-Verdau werden 8 µl *random primer* (100 ng/µl), 3 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 2 µl Nuklease-freies Wasser gegeben. Nun werden für 5 Minuten bei 65°C die RNA Sekundärstrukturen aufgelöst und die Probe anschließend sofort auf Eis gestellt. Es werden 10 µl 5x 1st strand buffer, 6 µl DTT (100 mM) und

3 µl RNaseOUT zugegeben, 10 Minuten bei 25°C zur Primeranlage-
rung inkubiert und anschließend 2 Minuten auf 42°C temperiert.
Nun werden 3 µl SuperScript II Reverse Transcriptase zugegeben
und 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach wird das Enzym 15
5 Minuten bei 70°C hitzedeaktiviert. Um die Gesamt-RNA von der
cDNA abzubauen, werden 3 µl RNase H zugegeben und 20 Minuten
bei 37°C inkubiert. Abschließend wird mit Nuklease-freiem
Wasser auf 100 µl aufgefüllt und die cDNA bei -80°C gelagert.
Die Qualität der cDNAs wird durch PCR mit Primern für ein
10 Haushaltsgen (GAPDH) bzw. für die 18S rRNA überprüft. Hierbei
ist zu erwarten, dass jeweils vergleichbare Produktmengen mit
den cDNAs aus den verschiedenen Geweben bzw. Zellen entstehen.
Die so hergestellten cDNAs werden jeweils zur Erstellung von
Expressionsmustern für die zu untersuchenden Transkripte
15 eingesetzt.

Für Northern-Blot-Analysen zur Erstellung von Expressionsmus-
tern wird Gesamt-RNA aus den Zellen bzw. Geweben in denaturie-
renden Gelen nach Größe getrennt, auf eine Nylon-Membran
übertragen und dort mit radioaktiv markierten, genspezifischen
20 Sonden hybridisiert. 6,0 g Agarose wird unter Erhitzen in
290 ml DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Danach wird im Wasser-
bad auf 60°C abgekühlt und 40 ml 10x MOPS-Puffer (200 mM MOPS,
50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) sowie 70 ml Formaldehyd
zugegeben. Schließlich wird ein Maxigel mit einem großen
25 Taschenformer (12 Spuren) im Abzug gegossen und dort erstarren
lassen. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA in 10 µl werden mit 40 µl
Probenpuffer (500 µl deionisiertes Formamid, 160 µl Formalde-
hyd, 100 µl 10x MOPS, 240 µl DEPC-behandeltes Wasser) für 15
Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis über-
30 führt. Nun werden 10 µl Beladungspuffer (500 µl Glycerin, 2 µl
500 mM EDTA, 25 µl 10% Bromphenolblau, 473 µl DEPC-behandeltes
Wasser) zugegeben und die Probe auf das mit 1x MOPS-Puffer

überschichtete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird für 3-4 h bei 250 V durchgeführt. Danach wird das Gel erst 10 Minuten in Wasser geschwenkt, anschließend 30 Minuten in 10x SSC. Ein auf Gelgröße zugeschnittener Hybond XL-Filter wird 15
5 Minuten in 10x SSC geschwenkt.

Aufbau des Blots (von unten nach oben): Salzbrücke (taucht in Pufferreservoir mit 10x SSC ein), Gel, Filter, 5 3MM (vorher in 10x SSC eingelegt), ca. 7 cm grüne Tücher (Zellstofftücher), Glasplatte, Gewicht von ca. 0,5 kg. Das Blotting erfolgt für 16-20 h. Danach wird der Blot abgebaut und der
10 Hybond XL-Filter für 10 Minuten in 2x SSC gewaschen. Die RNA wird nun in einem UV-Crosslinker mit 70.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ auf dem Hybond Filter fixiert. Danach wird der Filter 1 Minute in Färbelösung (300 mg Methylenblau in 1 L 0,3 M Na-Acetat)
15 gefärbt, um die RNA sichtbar zu machen und danach zum Entfärben des Hintergrunds 2 Minuten mit Wasser gewaschen. Die gefärbten Filter werden photographisch dokumentiert. Anschließend wird der Filter zwischen 3MM-Papier getrocknet, in Saran Wrap eingepackt und bei -20°C gelagert.

20 Die Hybridisierungen erfolgen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden (*Rediprime II*, Amersham), die über ProbeQuant G-50 Säulen (Amersham) gereinigt wurden, unter Benutzung von *ExpressHyb* Lösung (Clontech) nach den Herstellerangaben. Nach einer ersten Überprüfung der Hybridisierung mit Hilfe des
25 Phosphoimagers FLA-5000 (Fuji) werden Autoradiogramme auf Biomax MS-Filmen (Kodak) angefertigt.

Vervollständigung von cDNA-Sequenzen

Zu interessierenden BHS-spezifischen Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank werden die vollständigen cDNA-Sequenzen durch
30 Durchmusterung von verschiedenen cDNA-Banken und RACE-PCR Experimente ermittelt.

Eine cDNA-Bank wird aus BMEC von Schwein mit dem *SMART cDNA Library Construction Kit* (Clontech) im Vektor λ TriplEx2 nach den Herstellerangaben angelegt. Hierzu wird zuerst wie oben beschrieben Gesamt-RNA mit *Trizol* (Invitrogen) isoliert und
5 daraus polyA⁺-RNA mit Hilfe von *Dynabeads* (Dyna) angereichert. Zur Herstellung der Bank werden 2 μ g polyA⁺-RNA aus BMEC eingesetzt. Abschließend werden die Ligationen *in vitro* mit dem Phagenextrakt *Gigapack III Gold* (Stratagene) nach den Herstellerangaben verpackt. Die Anzahl unabhängiger Phagen der cDNA-
10 Bank aus BMEC beträgt 1,3 Millionen pfu, von denen mehr als 99% bei Durchführung eines Blau/Weiß-Tests (vgl. Sambrook et al., 1989) rekombinant waren. Mindestens die Hälfte der Inserts hat eine Größe von mehr als 1 kb. Nach Amplifikation der kompletten Bank beträgt der Titer ca. 2×10^{10} pfu/ml bei einem
15 Gesamtvolumen von ca. 150 ml. Dieses Phagenlysat wird auf 7 (v/v) % DMSO eingestellt und bei -80°C gelagert. Die beschriebene Phagenbank wird in eine Plasmidbank nach Herstellerangaben (Clontech *ClonCapture cDNA Selection Kit*) konvertiert, indem *E.coli* BM25.8 mit 2 Millionen pfu der Phagenbank infi-
20 ziert wurden. Dieser Bakterienstamm exprimiert Cre-Rekombinase, welche die loxP-Stellen in dem Vektor λ TriplEx2 erkennt und so die Konvertierung ermöglicht. Die Umwandlung der lamda-Phagen in Plasmide erfolgt hierbei durch *in vivo*-Exzision und anschließende Zirkularisierung des vollständigen
25 Plasmids. Die erhaltenen Plasmide werden dann stabil in *E. coli* weitergegeben. Die Plasmidpräparation erfolgt von Plattenkulturen infizierter BM25.8 mit dem *NucleoBond Plasmid Kit* (Clontech).

Zur Durchmusterung von cDNA-Plasmidbanken mit *ClonCapture*
30 werden biotinylierte cDNA-Sonden eingesetzt. Diese bilden in einer RecA-vermittelten Reaktion DNA-Triplexstrukturen mit homologen Sequenzen der Plasmidinsertionen. Die so selektier-

ten Plasmide können über an magnetische Kügelchen gekoppeltes Streptavidin isoliert und in eine Transformation eingesetzt werden. Klone aus einer solchen Anreicherung werden dann durch Koloniehybridisierung durchmustert, von daraus resultierenden positiven Klonen wird die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

Die Isolierung positiver Klone durch *ClonCapture* wird genau nach Herstellerangaben (Clontech) durchgeführt. Zur Sondenherstellung wurde zuerst eine PCR mit genspezifischen Primern an einem geeigneten Plasmid optimiert, so dass nur ein Produkt entstand. Hierzu werden die Primer so gestaltet, dass sie maximal um 1°C voneinander abweichende Schmelztemperaturen haben sowie keine Primerdimere und keine stabilen Loops ausbilden. Die *Annealing*-Temperatur wird mit 2-5°C unter der nach der Formel $T_m = [(G+C) \times 4] + [(A + T) \times 2]$ berechneten Schmelztemperatur relativ hoch gewählt. Dies führt zu spezifischer Produktbildung, was sich bei der Kontrolle durch Gelelektrophorese in nur einer Bande äußert. Von diesem Produkt wird mit einer sterilen Pasteur-Pipette ein Stück aus einem Agarosegel entnommen und in 200 µl steriles Wasser überführt. Durch Verwirbeln und 30-minütige Inkubation bei 70°C wird die DNA aus dem Gelstück eluiert und dient als Matrize zur Sondenherstellung. Mit dieser Matrize werden Kontrollreaktionen mit und ohne Biotin-21-dUTP durchgeführt und in einem Agarosegel analysiert, da Biotin die PCR inhibieren kann. Bei erfolgreicher Kontrollreaktion wird nun in einer präparativen PCR die biotinylierte Sonde unter gleichzeitiger Zugabe von 10 µCi [α^{32} P]dCTP hergestellt. Nach 20 Zyklen werden 5 µl aus dem Ansatz auf einem Agarosegel überprüft und eventuell noch 5 weitere Zyklen angeschlossen. Anschließend wird das PCR-Produkt mit dem *NucleoSpin Extraction Kit* (Clontech) nach Herstellerangaben gereinigt und mit 35 µl Elutionspuffer

eluiert. Hiervon werden 2 µl gelelektrophoretisch analysiert und das Produkt spektralphotometrisch quantifiziert. Zur Überprüfung der Biotinylierung werden 2 µl des gereinigten PCR-Produktes zu 15 µl Magnetkügelchen gegeben und das Präinkubationssignal mit einem Geigerzähler ermittelt. Nach 30 Minuten Inkubation unter leichtem Schütteln werden die Magnetkügelchen im Magneten abgetrennt und der Überstand erneut mit dem Geigerzähler quantifiziert (Postinkubationssignal). Bei erfolgreicher Biotinylierung ist das Präinkubationssignal 2-4 mal stärker als das Postinkubationssignal.

Für das Capturing werden 50 (200 bp) - 100 (600 bp) ng biotinyliertes PCR-Produkt in Wasser 5 Minuten bei 100°C denaturiert und danach sofort auf Eis überführt. Nun werden alle Komponenten außer der Plasmid-DNA zugegeben, wobei 2 µg RecA-Protein pro 50 ng Sonde eingesetzt werden. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C wird 1 µg der Plasmid-Bank zugegeben und weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit werden 15 µl Magnetkügelchen mit Heringssperma-DNA unspezifisch abgesättigt und für die Reinigung des Capturings vorbereitet. Zum Capturing werden *EcoR* V geschnittene λ-DNA gegeben und nach Zugabe von SDS ein Proteinase K-Verdau für 10 Minuten bei 37°C durchgeführt. Diese Reaktion wird schließlich durch Zugabe von PMSF abgestoppt und der Capturingansatz wird über die Magnetkügelchen aufgereinigt. Die isolierten Plasmide werden mit 100 µl Elutionspuffer eluiert, gefällt und anschließend in 10 µl Wasser gelöst.

2 µl der über *ClonCapture* angereicherten Plasmidbank werden in elektrokompente *E.coli* DH5α transformiert und auf LB-Amp Platten ausplattiert. Positive Klone werden durch Kolonienhybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden (gleiches Amplikon wie bei Biotinylierung) nach Standardverfahren identifiziert. Die so erhaltenen Klone werden durch Kolonie-PCR

weiter verifiziert, wozu ein Primer aus dem erwähnten Amplikon und ein weiterer, stromabwärts gelegener Primer benutzt wird. Es ist zu vermeiden beide Primer aus dem Amplikon zu wählen, das als Sonde für ClonCapture benutzt wurde, um bei der Kolonie-PCR [es wird ein PCR-Ansatz durchgeführt, in den anstelle von DNA Bakterien aus einer einzelnen Kolonie gegeben werden] zu vermeiden, dass die Produktbildung nicht an den in den Bakterien enthaltenen Plasmiden, sondern durch kontaminierende Sonde erfolgt. Deshalb sollte mindestens 1 Primer außerhalb des Amplikons liegen, am besten 3' dazu gelegen sein, da diese Sequenz sowohl bekannt ist als auch in allen positiven Klonen der cDNA-Bank enthalten ist. Von positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA nach Standardverfahren (Birnboim and Doly, 1979) mit Hilfe von Qiagen-Säulen isoliert und nach dem Kettenabbruchverfahren sequenziert (Sanger et al., 1977). Zur Sequenzierung kann der „ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Version 2.0“ (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben benutzt werden. Die Produkte der Sequenzierungsreaktionen werden auf dem „ABI Prism 310 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems) analysiert.

Die RACE-PCR (Frohman et al., 1988) dient zur Ermittlung unbekannter cDNA-Sequenzen ausgehend von einem bekannten Sequenzabschnitt durch cDNA-Synthese gefolgt von der Einführung bekannter, synthetischer Enden zur Anlagerung des zweiten PCR-Primers.

Die 5'RACE-PCR wird mit dem 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei erfolgt zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese mit einem genspezifischen Primer (GSP1) und 1 µg Gesamt-RNA aus BMEC. An das 3' Ende dieser cDNA wird nach Reinigung der cDNA über GlassMAX-Säulen in einem zweiten Schritt mit Hilfe des Enzyms Terminale Desoxynukleotidtransfe-

rase ein Oligo-dC-Schwanz angehängt. Die erste PCR erfolgt an 5 µl getailter cDNA mit einem weiteren genspezifischen Primer (GSP2) und dem *abridged anchor primer*, der sich an den Oligo-dC-Schwanz anlagert. Die Spezifität der PCR wurde mit Hilfe
5 einer zweiten, verschachtelten PCR erhöht, die mit dem *abridged universal amplification primer* und einem dritten genspezifischen Primer (GSP3) an 5 µl 1:100-verdünntem PCR-Produkt aus der ersten PCR durchgeführt wird. Als Kontrolle dienen bei der zweiten PCR Ansätze mit jeweils nur einem Primer sowie eine
10 Wasserkontrolle. Nach gelelektrophoretischer Analyse wird eventuell das Produkt der zweiten PCR kloniert, wozu eine Ligation mit dem *pGEM-Teasy System II* (Promega) und Transformation in elektrokompente DH5α durchgeführt wird. Die erhaltenen Klone werden mit Hilfe von Kolonie-PCR untersucht, die
15 Plasmid-DNA wird präpariert und schließlich in an sich bekannter Weise sequenziert.

Die 3'RACE-PCR kann mit dem *3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Bei der 3'RACE-PCR erfolgt die cDNA-Erststrangsynthese an 5 µg Gesamt-RNA aus BMEC mit dem Oligo-dT adapter
20 primer. Für die erste PCR werden 2 µl cDNA mit einem genspezifischen Primer (GSP1) und dem *abridged universal amplification primer* eingesetzt. Eine semi-nested zweite PCR wird wie bei der 5'RACE beschrieben mit einem genspezifischen Primer
25 (GSP2) und dem *abridged universal amplification primer* inklusive der Kontrollen durchgeführt. Die Produkte werden wie beschrieben kloniert und sequenziert.

Nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren können gezielt BHS-spezifische Proteine oder auch Fragmente davon in Hirnkapillar-Endothelzellen identifiziert werden. Die vorstehende
30 Beschreibung erlaubt natürlich Routinevariationen, die einem

Fachmann offensichtlich sind. Beispielsweise können folgende Verfahrensschritte variiert werden:

- Es können isolierte BMEC ausgesät werden und eine Primärkultur anstelle der frischen BMECs als „Tester“ bei der Subtraktion verwendet werden.
- Es kann ein anderes Subtraktionsgewebe („Driver“), z.B. dedifferenzierte BMEC aus der Kultur (min. Passage 2) gewählt werden.
- RNA bzw. mRNA können nach jeder anderen einem Fachmann bekannten Methode präpariert werden, mit der Maßgabe, dass die RNA intakt ist bzw. die mRNA sich durch Reverse Transkription in cDNA umschreiben lässt.
- Die PCR-Produkte aus der Subtraktion können in jedes geeignete Vektorsystem kloniert werden, sowohl über Polymerase-bedingte 3' dA-Reste, als auch über glatte Enden oder nach Restriktion. Die Transformation kann in verschiedene *E. coli*-Stämme erfolgen, sowohl in chemisch- als auch in elektrokompetente Zellen, wie auf dem Fachgebiet gut bekannt ist.
- Der Schritt der differentiellen Hybridisierung ist optional, aber empfehlenswert. Hierbei können auch andere geeignete Membranen (z.B. positiv geladene oder ungeladene Nylon-Membranen) sowie andere Hybridisierlösungen benutzt werden. Stringentes Waschen der Membranen kann auch bei anderen Temperaturen bzw. mit anderen Lösungen erreicht werden (z.B. niedrige Temperaturen und niedriger Salzgehalt bzw. höhere Temperatur und höherer Salzgehalt, z.B. T=50-70°C, 0,5-0,05 x SSC/0,1% SDS).

- Expressionsmuster können auch durch quantitative PCR (*real-time* PCR) mit den entsprechenden cDNAs ermittelt werden. Zweckmäßigerweise wird die quantitative PCR mit dem Opticon (MJ Research) durchgeführt. Zur Durchführung der Reaktion wird das „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ von Qiagen benutzt, wobei PCR-Bedingungen wie vorstehend beschrieben verwendet werden. Zur Quantifizierung wird jeweils eine Verdünnungsreihe aus BMEC cDNA hergestellt, die Angaben erfolgen in Picogramm eingesetzten RNA-Äquivalenten. Zur Durchführung der relativen Quantifizierung werden jeweils die berechneten Mengen an Target durch die berechneten Mengen an 18S rRNA geteilt. Abschließend wird eine Probe, z.B. BMEC, als 100 % gesetzt und alle anderen Proben darauf bezogen.
- Die cDNAs können auch mit Hilfe anderer Systeme hergestellt werden. Northern-Blot Analysen können auch mit anderen geeigneten Sonden und Hybridisier-/Waschlösungen durchgeführt werden.
- cDNAs können auch durch *database mining* mit Hilfe bekannter, überlappender Sequenzen erweitert werden. Experimentell können auch beliebige andere cDNA-Banken aus Zellen bzw. Geweben, in denen das gesuchte Transkript vorkommt, mit verschiedenen Systemen durchmustert werden bzw. RNA aus Zellen bzw. Geweben, in denen das gesuchte Transkript vorkommt, in die RACE-PCR eingesetzt werden (vgl. Sambrock, 1989). Für RACE-PCRs können beliebige andere, geeignete, einem Fachmann bekannte Systeme benutzt werden.

Die mit diesem Verfahren identifizierten Proteine oder Fragmente besitzen eine Spezifität für die Blut-Hirn-Schranke und sind auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die Kenntnis der Spezifität eines Proteins oder Fragments davon für die

Blut-Hirn-Schranke erlaubt nun die gezielte Auffindung der Funktion des Proteins. In der Regel erfolgt die Funktionsermittlung mittels Vergleich mit bekannten Sequenzdaten in verfügbaren Datenbanken, zum Beispiel unter Verwendung des BLAST-Algorithmus. Die Kenntnis der Spezifität der identifizierten Proteine erlaubt ferner eine gezielte Modulation ihrer Expression in der Blut-Hirn-Schranke, wodurch pathologische Zustände gezielt therapiert werden können.

So können Agonisten oder Antagonisten zu den jeweiligen BHS-spezifischen Proteinen entwickelt werden, die selektiv deren Aktivität modulieren. Die Expression solcher Proteine kann auch direkt moduliert werden, z.B. durch Gentransfer oder anti-sense RNA. Für therapeutische Ansätze besonders attraktiv ist die Entwicklung „Trojanischer Pferde“ - Medikamente, die an Moleküle gekoppelt sind, welche aktiv von identifizierten Transportern über die BHS transportiert werden. Möglich sind auch sogenannte *pro drugs*, Substanzen, die von BHS-spezifischen Enzymen in den Endothelzellen modifiziert werden und so ihre therapeutische Wirkung erlangen.

BHS-spezifische Proteine erfüllen vielfältige Funktionen. Zum Beispiel dienen sie der Nährstoffversorgung (Beispiel Glucosetransporter GLUT1) oder dienen als Kontaktproteine (z.B. ZO-1 als tight junction-Protein). Ferner besitzen sie enzymatische Aktivität (z.B. Glutamyltranspeptidase GGT) oder fungieren als Transportvehikel für Aminosäuren.

Expression BHS-spezifischer Proteine bei Ischämie

Das Expressionsverhalten der erfindungsgemäß identifizierten BHS-spezifischen Proteine bei Ischämie wurde untersucht. Dazu wurden die präparierten Endothelzellen nach dem Waschen resuspendiert und wie bei Franke et al. (2000) beschrieben in mit Kollagen beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät. Die

Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in CO₂-Inkubatoren mit einem konstanten CO₂-Gehalt von 5%. Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie durch eine Behandlung mit Trypsinlösung abgelöst und in dafür vorbereitete Trans-

5 wellschalen (44 cm², Corning) gesplittet. Nach 3 Tagen Kultivierung der Zellen unter den bereits beschriebenen Bedingungen wurde der Transwell-Ansatz in eine Schale umgesetzt, an deren Boden C6-Glioma-Zellen (handelsüblich, z.B. zu beziehen von der ATCC) gewachsen waren. Die zwei Zelltypen wurden zwei Tage

10 in Kokultur unter Zusatz von Hydrocortison weiterkultiviert. Für das Experiment zur Expression unter Ischämie wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Das neue Medium wurde vorher mit 0,2% O₂, 94,2% N₂ und 5% CO₂ begast und enthielt keine Glukose. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37°C in CO₂-

15 Inkubatoren mit 0,2% O₂, 94,2% N₂ und 5% CO₂ aufbewahrt. Bei der Kontrolle wurde ebenfalls ein Mediumwechsel vorgenommen. Das Medium wurde vorher mit 21% O₂, 74% N₂ und 5% CO₂ begast und enthielt Glukose. Die Zellen wurden für 24 h unter diesen Bedingungen weiterkultiviert. Danach wurde die Expression des

20 jeweiligen Proteins quantitativ - wie vorstehend beschrieben - bestimmt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wurden nun die folgenden Proteine an der Blut-Hirn-Schranke identifiziert.

Beispiel 1: Identifizierung von S129 = ITM2A

25 Frisch aus dem Gehirn von Schweinen wie vorstehend beschrieben isolierte und gereinigte BMEC wurden in M199-Medium (Sigma) mit 10 (v/v) % Ochsen-Serum (PAA) auf Kollagen G (Biochrom) kultiviert und durch Trypsinieren passagiert. Aus kultivierten BMEC wurden von der Primärkultur (P0) sowie von den Passagen

30 1-3 (P1-3) aus jeweils einer T75 Zellkulturflasche Gesamt-RNA wie oben beschrieben isoliert. Hieraus wurde wie bereits

beschrieben cDNA hergestellt und auf ihre Qualität untersucht. Expressionsmuster wurden mit den jeweiligen genspezifischen Primern vergleichend zwischen frischen BMEC und P0-3 erstellt, jeweils unter Bezug auf GAPDH bzw. 18S rRNA. Es wurden die in diesem und in den folgenden Beispielen beschriebenen Klone erhalten.

Der subtraktive Klon S129 zeigte im differentiellen Screen mit der forward probe im Vergleich zur reverse probe ein > 5mal stärkeres Signal und wurde somit zur Sequenzierung ausgewählt.

Die Sequenz des Klons S129 ist als SEQ ID NO:1 angegeben. Anhand dieser Sequenz wurde S129 eindeutig als Itm2A identifiziert.

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für Itm2A mit den Primern Itm2a.s2 (5' ACC TCC ATT GTT ATG CCT CCT A 3' = SEQ ID NO 2) und Itm2a.as2 (5' GTT GCC TCT CAC TCT TGA CAG A 3' = SEQ ID NO 3) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt. Das Expressionsmuster wurde mittels RT-PCR erhalten (nicht dargestellt).

Das semi-quantitative Expressionsmuster zeigt, dass Itm2A in BMEC stärker exprimiert ist als in AOEC und bestätigt somit das Ergebnis der differentiellen Hybridisierung. Außerdem ist die Expression in BMEC auch deutlich stärker als in Cortex (Gehirn), was ein Hinweis auf die Spezifität für BMEC im Gehirn ist. Lediglich im Herzen ist eine starke Expression zu sehen, was eventuell mit der beschriebenen Expression in Muskel korreliert werden kann. Das Expressionsmuster wurde durch Northern-Blot-Analyse verifiziert, als Sonde diente hierbei die kodierende Region von Itm2A aus Schwein (Figur 1a).

Im Northern Blot wird die Spezifität für BMEC noch deutlicher. Diese Expression in BMEC und somit an der BHS ist bisher nicht beschrieben.

Weiterhin kann man im Northern Blot ein zweites, kleineres
5 Transkript in BMEC erkennen. Um dieses zu charakterisieren wurden die kodierende Region, sowie 5' und 3' nichtkodierende Region mit RT-PCR bzw. RACE-PCR in BMEC untersucht. Hierbei ergab sich, dass für Itm2A zwei 3' nichtkodierende Regionen existieren, wovon die kürzere durch ein alternatives Polyade-
10 nylierungssignal entsteht, wie sich durch Sequenzierung zeigte. Auch dies war bisher für Itm2A nicht beschrieben. Wahrscheinlich wird durch zwei verschiedene 3' Regionen die Transkripthäufigkeit über verschiedene Stabilitäten reguliert und somit auch die Proteinmenge. Die beschriebenen Experimente
15 lieferten auch die vollständige cDNA-Sequenz (vollständige CDS 119-910) für Itm2A aus Schwein (SEQ ID NO 4 + SEQ ID NO 5).

Die Expression des Targets Itm2A/S129 unter ischämischen Bedingungen wurde gemäß der vorstehend angegebenen allgemeinen experimentellen Vorschrift untersucht. Dabei zeigte sich, dass
20 das Target S129 in BMEC unter Ischämie in der Expression stark vermindert ist. Dies spricht für eine Beteiligung von Itm2A bei Krankheiten, die mit ischämischen Bedingungen verbunden sind, wie beispielsweise Schlaganfall, Herzinfarkt und tumor-assozierte Zustände, wie sie beispielsweise bei einem Glioblastom
25 vorkommen. Das festgestellte Expressionsmuster belegt zum einen die Verwendbarkeit des Targets als diagnostischer Marker bei diesen Erkrankungen, zum anderen die therapeutische Verwertbarkeit des Targets zur ursächlichen Behandlung der oben genannten Erkrankungen. Das Expressionsmuster von Itm2A
30 in BMEC unter Ischämie verglichen mit einer als 100% angesetzten Kontrolle ist in Figur 1b gezeigt. BMEC wurden wie im Methodenteil beschrieben einmal unter Ischämie-Bedingungen

(„Ischämie“) und einmal unter Normalbedingungen („Kontrolle“) kultiviert. Anschließend wurde die Expression von Targets in beiden Proben relativ zur 18S rRNA gemessen. Der erhaltene Wert wurde für die Kontrolle als 100% gesetzt und die Ischämie-Probe darauf bezogen.

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von Itm2A an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH untersucht. Das Resultat ist in Figur 2 dargestellt. Diese Daten zeigen eine schnelle Abnahme der Expression vor Itm2A, wie auch für bekannte BHS-Marker beschrieben ist. Ein Haushaltsgen wie GAPDH zeigt dagegen keine Regulation.

Die Daten weisen deutlich auf eine Funktion von Itm2A an der BHS hin. Berücksichtigt man die Rolle des Proteins bei der Differenzierung in Chondrozyten und T-Zellen, kann man folgern, dass Itm2A auch für den besonderen Differenzierungszustand von Endothelzellen an der BHS verantwortlich ist. Da Itm2A nachweislich in bestimmten Zuständen von Zellen in der Plasmamembran lokalisiert ist, stellt es hier dem Anschein nach einen Rezeptor dar, indem es eventuell Homo- oder Heteromultimere bildet. Der extrazelluläre Anteil eines solchen Rezeptors würde sekretierte Moleküle oder Oberflächenmoleküle anderer Zellen binden, der intrazelluläre Anteil des Rezeptorkomplexes könnte in einem solchen Modell - z.B. durch Konformationsänderungen aufgrund der erfolgten Bindung - Signale weiterleiten, die innerhalb von Signalkaskaden eine Antwort der Zelle auslösen und so deren Eigenschaften verändern.

Itm2A wurde in einem differentiellen Screen einer cDNA-Bank aus Kondylen (Gelenkkopf) aus Maus zuerst durch Delersnijder et al. (1996) gefunden. Das kodierte Protein besteht aus 263 Aminosäuren und stellt ein integrales Membranprotein vom Typ

II dar. Es besitzt eine potentielle Glykosilierungsstelle sowie einen möglichen leucine zipper. Das Gen, das aus sechs Exons besteht, ist am stärksten in knochenbildenden Geweben exprimiert und stellt einen Marker für die Differenzierung 5 Knorpel/Knochen dar. Itm2A ist Mitglied einer neuen Genfamilie, die aus drei Mitgliedern besteht. Zwischen Mensch und Maus sind die einzelnen Mitglieder der Familie jeweils hoch konserviert. Die Konservierung unter den einzelnen Mitgliedern beträgt nur ca. 40%, wobei vor allem der C-Terminus konser- 10 viert ist, jedoch nicht der N-Terminus. Das leucine zipper Motiv findet sich nur bei Itm2A, ansonsten enthalten die Proteine der Familie keinerlei bekannte Sequenzmotive.

Beispiel 2: Identifizierung von S231

Der subtraktive Klon S231 zeigte im differentiellen Screen mit 15 der *forward probe* im Vergleich zur *reverse probe* ein > 5mal stärkeres Signal und wurde somit zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenz des Klons S231 ist als SEQ ID NO:6 angegeben. Bei BLAST-Homologiesuchen zeigte die Sequenz S231 die höchste Homologie zu EMP1.

20 Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für S231 mit den Primern S231.1 (5' CCA TAA CTC TTT CAC GCA ACT G 3' = SEQ ID NO 7) und S231.1R (5' ACA ACA GAG GAG TTG GCT GTT T 3' = SEQ ID NO 8) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt (siehe Figur 3).

25 Dieses semi-quantitative Expressionsmuster zeigt, dass S231 in BMEC stärker exprimiert ist als in AOEC und bestätigt somit das Ergebnis der differentiellen Hybridisierung. Außerdem ist die Expression in BMEC auch deutlich stärker als in Cortex (Gehirn), was ein Hinweis auf die Spezifität für BMEC im 30 Gehirn ist. Lediglich im Herzen ist eine starke Expression zu sehen, jedoch nur schwach in Lunge, Colon oder Gehirn, obwohl

für diese Gewebe eine starke Expression in der Literatur (Gehirn nur für Ratte) beschrieben ist. Dies legt die Frage nahe, ob S231 wirklich EMP1 aus Schwein darstellt oder ein anderes Mitglied dieser Genfamilie ist.

- 5 Um dies zu klären wurde die cDNA-Bank (λ TriplEx2) aus BMEC mit S231 als Sonde (radioaktiv markiert, Standardverfahren) durchmustert. Es wurden mehrere Klone isoliert, von denen die beiden größten Klone jeweils 5' ansequenziert wurden. Beide Sequenzen zeigten wieder die größten Homologien zu EMP1, wobei
10 die Überlappungen jeweils im 3' nichtkodierenden Bereich lagen.

- Zur Untersuchung, ob es sich bei S231 tatsächlich um EMP1 aus Schwein handelt, wurde mit den Primern hsEMP1.s1 (5' GGT ATT GCT GGC TGG TAT CTT T 3' = SEQ ID NO 9) und hsEMP1.as1 (5' ATG
15 TAG GAA TAG CCG TGG TGA T 3' = SEQ ID NO 10), die aus der kodierenden Region des humanen EMP1 abgeleitet wurden, eine RT-PCR mit BMEC durchgeführt. Das erhaltene Produkt (ssEMP1) wurde kloniert und sequenziert. Aus dieser Sequenz wurde der Primer ssEMP1.1 (5' GGT CTT TGT GTT CCA GCT CTT C 3' = SEQ ID
20 NO 11) abgeleitet. Ein zweiter Primer ssEMP1.1R (5' TTC TCA GGA CCA GAT AGA GAA CG 3' = SEQ ID NO 12) wurde aus einem Abschnitt absoluter Übereinstimmung zwischen der kodierenden Sequenz des humanen EMP1 und dem EST F23116 aus Schwein abgeleitet. Mit diesen beiden Primern ssEMP1.1/ssEMP1.1R wurde ein
25 Expressionsmuster wie oben beschrieben erstellt (vgl. Figur 4).

- Die Expressionsmuster mit den Primern aus Klon S231 und aus ssEMP1 sind zwar ähnlich, jedoch keineswegs identisch. Deshalb ist zu postulieren, dass S231 ein anderes Mitglied aus der
30 pmp-22/emp/mp20-Genfamilie darstellt.

Beide Expressionsmuster wurden nun durch Northern-Blot-Analysen verifiziert, wobei als Sonde der Klon S231 (Fig. 5A) bzw. das PCR-Produkt hsEMP1.s1/hsEMP1.as1 (EMP1) (Fig. 5B) benutzt wurde (vgl. Figur 5).

- 5 Im Northern Blot wird die Spezifität für BMEC noch deutlicher. Diese Expression in BMEC und somit an der BHS ist bisher nicht beschrieben.

Auffällig ist die im Northern Blot stärkere Expression in Plexus (hier war allerdings auch ca. die 2-3fache RNA-Menge
10 aufgetragen) und Colon, wohingegen die Expression durch RT-PCR stärker im Herzen war. Weiterhin ist das Verhältnis der beiden Transkripte in BMEC deutlich verschieden, abhängig von der benutzten Sonde. Mit S231 ist das Verhältnis von größerem zu kleinerem Transkript annähernd gleich, wohingegen bei EMP1 als
15 Sonde das kleinere Transkript bedeutend stärker erscheint.

Im Vergleich zu Expressionsdaten von EMP1 in der Literatur fällt auf, dass S231 aus Schwein andere Transkriptgrößen als EMP1 aus Mensch und Maus aufweist und dass weiterhin das Expressionsmuster z.T. stark von den Literaturdaten zu EMP1
20 aus verschiedenen Spezies abweicht. Diese Abweichungen auf Transkriptebene zeigen, dass der hier beschriebene Klon S231 nicht EMP1 darstellt, sondern als S231 ein anderes Mitglied dieser Genfamilie ist. Möglicherweise gibt es beim Menschen nur ein Gen EMP1, das von zwei Promotoren reguliert wird, und
25 beim Schwein wird diese Aufgabe jedoch von zwei getrennten Genen - EMP1 und S231 - wahrgenommen.

Um die vollständige kodierende Region von S231 aus Schwein zu erhalten, wurde die cDNA-Bank aus BMEC in pTriplEx2 mit EMP1 als ClonCapture-Sonde durchmustert. Hierbei wurden mehrere
30 positive Klone isoliert, welche die vollständige kodierende

Region enthielten. Diese wurde nun sequenziert und daraus die Proteinsequenz abgeleitet (SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 14).

Die Identität von S231 aus Schwein zu humanem EMP1 beträgt auf Aminosäureebene nur 78%, zu Maus beträgt sie 76%. Dies stärkt
5 weiterhin die These, dass S231 nicht EMP1 darstellt, da normalerweise Proteine zwischen Mensch und Schwein 85-95% identisch sind (vgl. Figur 7).

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von S231 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im
10 Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH wie in Beispiel 1 beschrieben untersucht (vgl. Figur 8). Diese Daten zeigen eine schnelle Abnahme der Expression von S231, wie auch für bekannte BHS-Marker beschrieben ist. Ein Haushaltsgen wie GAPDH zeigt dagegen keine Regulation.

15 Die gemäß der vorstehend gegebenen Vorschrift durchgeführte Western-Blot-Analyse für S231 bestätigt die Ergebnisse, die auf RNA-Ebene erhalten wurden. In BMEC ist eine starke Expression des Proteins zu erkennen, jedoch nicht in AOEC. Weiterhin zeigt der Western Blot, dass S231 hauptsächlich in der Memb-
20 ranfraktion vorkommt. In kultiviertem BMEC nimmt die Expression ab, allerdings ist verstärkt ein Protein mit geringerem Molekulargewicht nachzuweisen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um zwei verschiedene Homo- bzw. Heterodimere von S231. Der Western Blot ist in Figur 6 gezeigt.

25 Die Daten weisen deutlich auf eine Funktion von S231 an der BHS hin. Berücksichtigt man die beschriebene Rolle des Proteins bei der Differenzierung anderer Zelltypen, kann man folgern, dass S231 für den besonderen Differenzierungszustand von Endothelzellen an der BHS verantwortlich ist und möglicherweise ein Zelladhäsionsmolekül oder einen Kanal (Membrandomänen
30 am stärksten konserviert) darstellt.

Beispiel 3: Identifizierung von S012

Der subtraktive Klon S012 zeigte im differentiellen Screen mit der *forward probe* im Vergleich zur *reverse probe* ein >5mal stärkeres Signal und somit zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenz des Klons S012 ist in SEQ ID NO 15 aufgeführt. Anhand dieser Sequenz konnte S012 eindeutig dem humanen hypothetischen Protein FLJ13448 zugeordnet werden.

Zuerst wurde wie vorstehend beschrieben ein Expressionsmuster für S012 mit den Primern S012.s1 (5' GTA TCG GGA GTG GAG GAT TAC A 3' = SEQ ID NO 16) und S012.as1 (5' CCC GAG GTA TAT TTG TTT CTG G 3' = SEQ ID NO 17) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt (Expressionsmuster nicht gezeigt).

Dieses semi-quantitative Expressionsmuster zeigt, dass S012 in BMEC stärker exprimiert ist als in AOEC und bestätigt somit das Ergebnis der differentiellen Hybridisierung. Außerdem ist die Expression in BMEC auch deutlich stärker als in Cortex (Gehirn), was ein Hinweis auf die Spezifität für BMEC im Gehirn ist. Lediglich im Herzen ist eine starke Expression zu sehen. Die full-length cDNA von porcinem S012/FLJ13448 wurde durch überlappende 5' und 3' RACE-PCR erhalten und ist zusammen mit der Proteinsequenz in SEQ ID NO 18 und SEQ ID NO 19 gezeigt.

Das Expressionsmuster wurde durch Northern-Blot-Analyse verifiziert, als Sonde diente hierbei der full-length Klon FLJ13448/S012 (SEQ ID NO 18) (vgl. Fig. 9).

Im Northern-Blot wird die Spezifität für BMEC noch deutlicher. Diese Expression in BMEC und somit an der BHS ist bisher nicht beschrieben.

S012 ist homolog zu dem humanen hypothetischen Protein FLJ13448 und dem entsprechenden Homologen aus Maus (XM_129724). Ein Homologievergleich von humanem, murinem und procinem FLJ13448/S012 ist in Fig. 10 dargestellt. Die Peptide, die als Signalpeptide dienen und abgespalten werden, sind
5 jeweils kursiv gedruckt.

Auffällig ist die geringe Konservierung der N-terminalen 60 Aminosäuren bzw. die hohe Homologie des C-Terminus. Wahrscheinlich stellt der N-Terminus ein Signalpeptid dar, das für
10 die korrekte Lokalisation des Proteins in der Zelle verantwortlich ist. Bioinformatische Untersuchungen zeigen eine mitochondriale Lokalisation des Proteins in der Zelle. Die Funktion des Proteins ist dem stark konservierten C-Terminus zuzuordnen.

15 Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von FLJ13448/S012 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH untersucht wie in Beispiel 1 beschrieben (vgl. Fig. 11).

20 Diese Daten weisen eindeutig auf eine Rolle von FLJ13448/S012 an der BHS hin. Die starke Expressionsabnahme in kultivierten BMEC spricht dafür, dass FLJ13448/S012 mit dem Differenzierungszustand der Zellen in Zusammenhang steht.

Beispiel 4: Identifizierung von NSE2

Das Probenmaterial wurde wie vorstehend unter dem Abschnitt
25 „Identifizierung BHS-spezifischer Proteine durch differentielle 2D-Gelelektrophorese“ beschrieben aufbereitet.

Der differentielle Spot 1.1.0.1.10.37 ergab in der MALDI-TOF-Analyse folgende Peptidmassen: **861,499; 878,47; 975,50; 1056,61; 1132,53; 1198,71; 1216,71; 1227,53; 1347,69; 1430,76;**

1438,69; 1516,71; 1623,79; 1790,87; 1796,81; 1935,93; 1954,05; 2081,02; 2231,07; 2375,08; 2577,09; 2613,1.

Durch die Datenbankabfragen mit Profound in der NCBI-Datenbank wurde Spot 1.1.0.1.10.37 als NSE2 identifiziert. Das humane
5 NSE2 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 34,5 kDa und einen pI-Wert von 5,4, was beides sehr gut mit der beobachteten Lage des Spots 1.1.0.1.10.37 im 2D-Gel übereinstimmt. Die fettmarkierten, unterstrichenen Peptidmassen konnten als der humanen Sequenz identisch zugeordnet werden. In Fig. 12 ist
10 die Abdeckung der Peptidmassen auf der humanen Proteinsequenz gezeigt.

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für NSE2 mit den Primern ssNSE2.s1 (5' CGC GTG GTG AAT GAT CTG TA 3' = SEQ ID NO 20) und ssNSE2.as1 (5' CTC CAT GAT CAG GTC CTC CAG
15 3' = SEQ ID NO 21) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt.

Dieses semi-quantitative Expressionsmuster zeigt, dass die Expression von NSE2 im Herzen am höchsten ist, gefolgt von BMEC und Cortex (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wurde durch
20 Northern-Blot-Analyse bestätigt (vgl. Figur 13). Zur Hybridisierung wurde die partielle cDNA-Sequenz von NSE2 aus Schwein verwendet (SEQ ID NO 22 und SEQ ID NO 23) (partielle CDS 1-192, codiert C-Terminus), die durch 3'RACE-PCR erhalten wurde.

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von NSE2 an der BHS zu
25 erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH wie in Beispiel 1 beschrieben untersucht. Das Ergebnis ist in Figur 14 gezeigt. Diese Daten zeigen eine schnelle Abnahme der Expression von NSE2 und weisen somit auf eine Funktion von NSE2 an der
30 BHS hin.

Figur 15 zeigt einen Homologie-Vergleich von humanem NSE2 und NSE1.

Potentielle Phosphorylierungsstellen sind in hellem Font dargestellt. Unterstrichen ist eine mögliche Tyrosin-Kinasedomäne (ProSite Pattern Match PS00109), wobei der aktive Rest fett dargestellt ist. Figur 16 zeigt die Verteilung von PEST-Domänen in NSE2. PEST-Sequenzen sind Pro-, Glu-, Ser- und Thr-reich Regionen in Proteinen, die für eine kurze Halbwertszeit solcher Proteine in der Zelle verantwortlich sind, indem sie die Ubiquitinierung dieser Proteine kontrollieren. Phosphorylierung bestimmter Ser- oder Thr-Reste in den PEST-Regionen (hellgrau) sind für die Erkennung von Prozessierung durch den Ubiquitinproteasomeweg wichtig.

Position 81-163 in humanem NSE2 zeigt Homologien zur NLP/P60-Familie (pfam-Domäne 00877.4), die in mehreren Lipoproteinen gefunden aber der keine Funktion zugeordnet wurde.

Auch dieses Target wurde unter ischämischen Bedingungen untersucht. Dabei zeigt es sich, dass NSE2 in BMEC unter Ischämie in seiner Expression vermindert ist (vgl. Figur 17). Dies spricht für eine Beteiligung von NSE2 bei Krankheiten, die mit ischämischen Zuständen verbunden sind, wie beispielsweise Schlaganfall, Herzinfarkt und tumorassoziierte Zustände, wie beispielsweise bei einem Glioblastom. Das Expressionsmuster von NSE2 kann somit als diagnostischer Marker bei derartigen Erkrankungen verwendet werden. Ferner kann eine ursächliche Therapie an der Modulation der Expression von NSE2 ansetzen.

Beispiel 5: Identifizierung von DRG-1

Das Probenmaterial wurde wie vorstehend unter dem Abschnitt „Identifizierung BHS-spezifischer Proteine durch differentielle 2D-Gelelektrophorese beschrieben“ aufbereitet.

Der differentielle Spot 1.1.0.1.11.12 ergab in der MALDI-TOF-Analyse folgende Peptidmassen: **789,45**; 880,47; **890,50**; **948,49**; **1204,68**; **1217,64**; **1289,58**; 1428,70; **1517,79**; **1573,73**; 1753,91; 2017,08.

5 Durch die Datenbankabfragen mit Profound in der NCBI-Datenbank wurde Spot 1.1.0.1.11.12 als hypothetisches Protein mit der Accession Number CAB66619 identifiziert. Das identische Protein wird in anderen Eintragungen der Datenbank auch als *dopamine responsive protein* DRG-1, als *LYST-interacting protein* LIP5
10 und als HSPC228 bezeichnet. Das hypothetische Protein CAB66619/DRG-1 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 33,8 kDa und einen pI-Wert von 6,1, was beides sehr gut mit der beobachteten Lage des Spots 1.1.0.1.11.12 im 2D-Gel übereinstimmt. Die fettmarkierten Peptidmassen konnten als der huma-
15 nen Sequenz identisch zugeordnet werden. In Fig. 18 ist die Abdeckung der Peptidmassen auf der humanen Proteinsequenz gezeigt.

Ein Homologievergleich zwischen Mensch (CAB66619) und Maus (XP_125508) zeigt sehr große Homologien, vor allem im Bereich
20 der AS 1-180. Bioinformatische Ansätze zeigen eine Transmembrandomäne und sprechen dafür, dass der N-Terminus intrazellulär lokalisiert ist. Die intrazelluläre Domäne zeigt eine konservierte Phosphorylierungsstelle, extrazellulär wird in der humanen Sequenz eine Glykosylierungsstelle vorhergesagt
25 (vgl. Fig. 19).

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für DRG-1 mit dem CAB66619.s1 (5' CGA GAC CCT GTG GTG GCT TAT TAC 3' = SEQ ID NO 24) und CAB66619.as1 (5' CTG GTG TAT TAG CTG GAG CGT GTG 3' = SEQ ID NO 25) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH
30 benutzt.

Dieses semi-quantitative Expressionsmuster (Figur 20; das durch Northern-Blot-Analyse bestätigt wurde) zeigt, dass DRG-1 aus Schwein in BMEC schwächer exprimiert ist als in AOEC und widerspricht somit dem Ergebnis des 2D-Gels. Allgemein ist

5 DRG-1 zwar unterschiedlich stark aber recht ubiquitär exprimiert. Somit muss der im 2D-Gel gefundene Unterschied auf eine spezifische posttranslationale Modifikation von DRG-1 in BMEC zurückzuführen sein. Ein solcher Unterschied kann z.B. aufgrund der vorhergesagten Phosphorylierungsstelle auftreten.

10 Zellspezifische Phosphorylierungen können so die Aktivität des Proteins bestimmen.

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von DRG-1 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH wie in Beispiel

15 1 beschrieben untersucht (vgl. Figur 21). Diese Daten zeigen eine deutliche Abnahme der Expression von DRG-1 und weisen somit auf eine Funktion von DRG-1 an der BHS hin.

SEQ ID NO 26 + 27 zeigen die partielle cDNA-Sequenz von DRG-1 aus Schwein (CDS1-585, interner Abschnitt).

20 **Beispiel 6: Identifizierung von TKA-1**

Das Probenmaterial wurde wie vorstehend unter dem Abschnitt „Identifizierung BHS-spezifischer Proteine durch differentielle 2D-Gelelektrophorese beschrieben“ aufbereitet.

Der differentielle Spot 1.1.0.1.6.30 ergab in der MALDI-TOF-

25 Analyse folgende Peptidmassen: **776,44**; 847,47; 900,50; 916,46; **976,52**; **1048,58**; 1085,61; 1127,66; 1137,55; 1167,67; **1180,68**; 1212,69; 1234,69; 1291,67; 1301,67; 1303,69; 1338,72; 1350,70; 1370,65; **1419,70**; 1423,77; 1434,79; **1440,79**; **1456,76**; 1466,76; 1467,71; 1483,77; **1547,78**; **1558,85**; 1665,90; **1714,96**; 1716,90;

1740,80; 1762,90; 1838,92; 1897,99; 2025,11; **2054,06**; 2234,15;
2243,20; 2244,18.

Durch die Datenbankabfragen mit MSFIT in der NCBI-Datenbank wurde Spot 1.1.0.1.6.30 als TKA-1 identifiziert. Die fettmarkierten, unterstrichenen Peptidmassen konnten als der humanen Sequenz identisch zugeordnet werden. In Fig. 22 ist die Abdeckung der Peptidmassen auf der humanen Proteinsequenz gezeigt.

In der Datenbank sind 3 Isoformen von TKA-1 zu finden, die folgende berechneten Massen und pI-Werte besitzen: CAA90511 mit 49,3 kDa / pI 6,7, BAA33216 mit 37,4 kDa / pI 7,9, AAB53042 mit 36,2 kDa / pI 8,2. Die Lage im 2D-Gel spricht eindeutig gegen die große Isoform. Somit wurde hier experimentell eindeutig die BAA33216-Isoform gefunden, da in dem Protein mit der Accession-Number AAB53042 das Peptid *DGSAWKQDPFQ* (kursiv in Figur 22) fehlt, das jedoch teilweise (fett) innerhalb eines Trypsin-Fragmentes bei der MALDI-Analyse nachgewiesen wurde.

Das Alignment von TKA-1 zwischen Mensch, Maus und Ratte zeigt eine sehr hohe Konservierung. TKA-1 besitzt zwei PDZ-Domänen, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. In diesen PDZ-Domänen befinden sich mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen, wodurch möglicherweise die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen reguliert werden. Konserviert ist auch eine potentielle N-Glykosylierungsstelle.

Zuerst wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für TKA-1 mit den Primern ssSLC9A3R2.s1 (5' AAA AGG CCC CCA GGG TTA CG 3' = SEQ ID NO 28) und ssSLC9A3R2.as1 (5' GGA GTG GGC AGC AGG TGA GC 3' = SEQ ID NO 29) erstellt, als Kontrolle wurde GAPDH benutzt.

Das Expressionsmuster wurde durch Northern-Blot-Analyse verifiziert, als Sonde diente hierbei das 550 bp große PCR-Produkt ssTKA-1.ctg zwischen den beiden Primern ssTKA-1ctg.sl (5' TTA ACC TGC ACA GCG ACA AGT 3' = SEQ ID NO 30) und ssTKA-1ctg.asl
5 (5' TTG CTG AAG ATC TCA CGC TTC 3' = SEQ ID NO 31).

Der Northern Blot (Figur 23) zeigt, dass TKA-1 in BMEC am stärksten exprimiert ist sowie dass in BMEC drei verschiedene Transkripte vorkommen. Die Expression ist vergleichbar stark in Lunge, allerdings fehlt hier das kleine Transkript vollkommen. Bisher ist in der Literatur kein Zusammenhang von TKA-1
10 zur BHS und auch nicht zu Endothelzellen beschrieben.

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von TKA-1 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH wie in Beispiel
15 1 beschrieben untersucht (vgl. Figur 24). Diese Daten zeigen eine deutliche Abnahme der Expression von TKA-1 und weisen somit auf eine Funktion von TKA-1 an der BHS hin.

Das Target TKA-1 wurde ebenfalls im Hinblick auf seine Expression unter Ischämie gemäß der vorstehend angegebenen Vorschrift untersucht. Dabei zeigt es sich, dass dieses Target in
20 BMEC unter Ischämie stark in der Expression vermindert ist. Dies spricht für eine funktionelle Beteiligung von TKA-1 an Krankheiten, die mit ischämischen Bedingungen einhergehen, wie beispielsweise Schlaganfall, Herzinfarkt und tumorassoziierte
25 Zustände, zum Beispiel beim Glioblastom. Die Untersuchung der Expression von TKA-1 kann deshalb als diagnostischer Marker bei derartigen Erkrankungen verwendet werden. Ebenso ist das Target TKA-1 ein geeigneter Ansatzpunkt für ursächliche Therapien gegen die oben genannten Erkrankungen.

30 Das Expressionsmuster von TKA-1 in BMEC unter Ischämie verglichen mit einer Kontrolle ist in Figur 25 gezeigt. BMEC wurden

wie im Methodenteil beschrieben einmal unter Ischämie-Bedingungen („Ischämie“) und einmal unter Normalbedingungen („Kontrolle“) kultiviert. Anschließend wurde die Expression von Targets in beiden Proben relativ zur 18S rRNA gemessen. Der erhaltene Wert wurde für die Kontrolle als 100% gesetzt und die Ischämie-Probe darauf bezogen.

Die Western-Blot-Analyse für TKA-1 bestätigt die Ergebnisse, die auf RNA-Ebene erhalten wurden. In BMEC ist eine starke Expression des Proteins zu erkennen, in AOEC jedoch kaum.

Weiterhin zeigt der Western Blot, dass TKA-1 hauptsächlich membranassoziiert und im Zellkern vorkommt. In kultiviertem BMEC nimmt die Expression sehr schnell ab und ist bereits in der ersten Passage nicht mehr zu detektieren. Die Western-Blot-Analyse von TKA-1 ist in Figur 26 gezeigt.

SEQ ID NO 32 und SEQ ID NO 33 zeigen die partielle cDNA-Sequenz von TKA-1 aus Schwein (partielle CDS 1-741, codiert den C-Terminus).

Beispiel 7: Identifizierung von S064/ARL8

Der subtraktive Klon S064 zeigte im differentiellen Screen mit der *forward probe* im Vergleich zur *reverse probe* ein >5mal stärkeres Signal und wurde somit zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenz des Klons S064 ist als SEQ ID NO 35 aufgeführt. Anhand dieser Sequenz konnte S064 keinem bekannten Gen zugeordnet werden. BLAST-Suchen ergaben eine signifikante Homologie zu dem DKFZ cDNA-Klon p43401317, der jedoch scheinbar keine kodierende Region enthält.

Um das korrespondierende Protein zu identifizieren, wurde mit dem subtraktiven Klon S064 eine cDNA-Bank aus BMEC von Schwein durchmustert. Hierbei wurden zwei unabhängige Klone identifiziert. Die Sequenz des längsten Klons S064.3 ist als SEQ ID NO

36 aufgeführt. Auch diese Sequenz konnte durch BLAST-Suchen keinem bekannten Gen zugeordnet werden.

Allerdings konnte die Sequenz von Klon S064.3 durch Homologievergleiche im humanen Genom in der Region 10p12 lokalisiert werden. Das nächste Gen in der gleichen Orientierung auf diesem Locus ist ADP-ribosylation-like factor 8 (ARL8). Um zu überprüfen, ob S064 ein neues 3'Ende von ARL8 darstellt, wurde eine link-PCR durchgeführt. Hierzu wurden die Primer hsARL8.s1 (5' TAA TGC AGG GAA AAC CAC CAT TCT 3', SEQ ID NO 37) und S064.3R (5' AAC CAA GAG ACA TGT TGG CAC T 3', SEQ ID NO 38) mit RNA aus BMEC in einer OneStep RT-PCR eingesetzt. Zur Überprüfung der Produktspezifität wurde das Produkt aus der OneStep RT-PCR 1:1000 verdünnt und in eine nested PCR mit den Primern hsARL8.s2 (5' ATA GCA TTG ACA GGG AAC GAC T 3', SEQ ID NO 39) und S064.GSP2 (5' CTG CTA GAT TCA AGT CAT CAT GC 3', SEQ ID NO 40) eingesetzt. Das hierbei erhaltene Produkt wurde kloniert und sequenziert. Die erhaltene Sequenz bestätigte eindeutig, dass der subtraktive Klon S064 das Gen ARL8 repräsentiert.

Die vollständige kodierende cDNA-Sequenz von ARL8 wurde mit Hilfe einer OneStep RT-PCR mit RNA aus BMEC und den Primern S064cds.s1 (5' CTC GTG ATG GGG CTG ATC TTC 3', SEQ ID NO 41) und S064cds.as1 (5' ATC TCA CAC CAA TCC GGG AGG T 3', SEQ ID NO 42) erhalten. Die kodierende Sequenz ARL8 aus Schwein ist als SEQ ID NO 43 angegeben, das hiervon kodierte Protein ist in SEQ ID NO 44 gezeigt. Das Protein ARL8 ist 100 % identisch zu ARL8 aus Mensch und Maus. Dieser hohe Konservierungsgrad spricht für die wichtige Rolle dieses Proteins. Die cDNA-Sequenz von ARL8 (Schwein) weist 95% bzw. 92% Homologie im kodierenden Bereich zur entsprechenden Sequenz aus Mensch bzw. Maus auf.

Es wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für S064 mit den Primern S064.s1 (5' AAG CCT GAA GCT TGA TGG ATA A 3', SEQ ID NO 45) und S064.as1 (5' CAA TTA CAG CTT TGC TCC TGT G 3', SEQ ID NO 46) erstellt, als Referenz wurde 18S rRNA benutzt.

5 Die beiden Primer S064cds.s1/as1 wurden aufgrund der hohen Homologie zwischen Mensch und Schwein (z.B. des Produkts der link-PCR) anhand der humanen Sequenz abgeleitet. Neben den allgemeinen Kriterien des Primerdesigns wurde darauf geachtet, dass die beiden Primer die komplette kodierende Sequenz flankieren: so enthält Primer S064cds.s1 in Position 7-9 das ATG-
10 Startcodon und die Position 22 in Primer S064cds.as1 stellt die erste Base des Stopcodons dar. Das Expressionsmuster ist in Figur 27 gezeigt.

Das Expressionsmuster wurde mit einem anderen Primerpaar aus
15 der kodierenden Region von ARL8 wiederholt: ARL8cds.s1 (5' ATA GCA TTG ACA GGG AAC GAC T 3', SEQ ID NO 47) und ARL8cds.as1 (5' GAA CTG AGG GTG AGG TAT TTG G 3', SEQ ID NO 48). Das Expressionsmuster ist in Figur 28 gezeigt.

Weiterhin wurde das Expressionsmuster durch Northern-Blot
20 Analyse verifiziert, als Sonde diente hierbei der Klon S064. Das Ergebnis ist in Figur 29 gezeigt.

Alle drei Experimente zeigen die sehr hohe Spezifität von ARL8 für BMEC und somit für die Blut-Hirn-Schranke. Diese Expression in BMEC bzw. an der BHS ist bisher nicht beschrieben. Diese hohe Spezifität weist auf eine sehr wichtige Rolle
25 von ARL8 an der BHS hin.

Um Hinweise auf die Art der Funktion von ARL8 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. GAPDH untersucht. Das
30 Ergebnis ist in Figur 30 gezeigt.

Die Daten zeigen eine schnelle Abnahme der Expression von ARL8 in kultivierten BMEC und weisen somit deutlich auf eine tatsächliche Funktion von ARL8 an der BHS hin.

ARL8 gehört zur RAS-Superfamilie der regulatorischen GTPasen.

- 5 Diese sind an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, wie z.B. Zellwachstum, Signaltransduktion, Organisation des Cytosketts und Regulation des membrane traffickings (Exo- bzw. Endocytose). ARL8 wurde erstmals von Sebald et al. 2003 beschrieben, jedoch konnten diese keine Expression im adulten
- 10 Gehirn zeigen. Das vorliegende Beispiel zeigt erstmalig die tatsächliche Expression von ARL8 an der BHS. Dies bestätigt die hohe BHS-Spezifität dieses Proteins. Daraus ergibt sich, dass ARL8 für den besonderen Differenzierungszustand von Endothelzellen an der BHS verantwortlich ist und somit zur
- 15 Funktionsfähigkeit der BHS beiträgt.

Beispiel 8: Identifizierung von 5G9/PNOV1

Der subtraktive Klon 5G9 zeigte im differentiellen Screen mit der *forward probe* im Vergleich zur *reverse probe* ein >5mal stärkeres Signal und wurde somit zur Sequenzierung ausgewählt.

- 20 Die Sequenz des Klons 5G9 ist als SEQ ID NO 49 aufgeführt. Anhand dieser Sequenz konnte 5G9 einem humanen Transkript (Nr. BC039195, NCBI-Datenbank) zugeordnet werden, das für ein neues Protein HSN OV1 kodiert (AAH39195). In diesem Datenbankeintrag, der ein mRNA-Molekül beschreibt, sind als Annotation der
- 25 offene Leserahmen und das daraus resultierende hypothetische Protein angegeben. Dabei handelt es sich nicht um experimentelle Daten, sondern um Computer-gestützte Vorhersagen. Das abgeleitete Protein zeigte keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen und wurde deshalb als *novel protein* bezeichnet.

- 30 Es wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für 5G9 mit den Primern 5G9.1 (5' TGT ATA TGT GGG ACA GCC ATC A 3', SEQ ID NO

50) und 5G9.1R (5' GTC CGA GCA GGA TAT ACT TCC A 3', SEQ ID NO 51) erstellt, als Referenz wurde 18S rRNA benutzt. Das Primerpaar zur Ermittlung des Expressionsmusters wurde nach den allgemeinen Regeln abgeleitet: Schmelztemperatur der Primer von 55-75°C; annähernd gleiche Schmelztemperatur der beiden Primer; 18-26 Basen Länge; optimal 40-60% GC-Gehalt; Vermeidung von hairpins loops; Vermeidung von Homo- und Heterodimerbildung; Produktgröße 100-300 bp. Das Expressionsmuster ist in Figur 31 gezeigt.

Das Expressionsmuster zeigt, dass 5G9 vor allem an der BHS, im Colon und der Niere gebildet wird. Im Gehirn scheint die Expression spezifisch für BMEC zu sein. Diese Expression in BMEC bzw. an der BHS ist bisher nicht beschrieben.

Um das korrespondierende Protein aus Schwein zu identifizieren, wurde ausgehend von der Sequenz des Klons 5G9 durch 5' und 3'RACE-PCR die vollständige cDNA PNOV1 aus Schwein isoliert (SEQ ID NO 52). Dieses Transkript kodiert von Position 480-1466 für ein Protein mit der SEQ ID NO 53. Der Homologievergleich zwischen HSNOV1 und PNOV1 ist in Figur 32 gezeigt.

Die Homologie zwischen HSNOV1 und PNOV1 beträgt 94%. Auffällig ist jedoch, dass PNOV1 N-terminal um 47 Aminosäuren verkürzt ist im Vergleich zu HSNOV1. Diese Sequenz stellt in HSNOV1 möglicherweise eine Signalsequenz dar, die später abgespalten wird.

Das Protein HSNOV1 zeigt keine signifikanten Homologien zu anderen bekannten Proteinen. Bioinformatische Analysen zeigen 8 potentielle Transmembrandomänen (vgl. Figur 33).

Außerdem konnten mehrere Domänen (z.B. InterPro-Domäne ipr002657) gefunden werden, die auf eine Funktion als Transporter hinweisen.

Diese Daten sprechen dafür, dass PNOV1/HSNOV1 einen neuen Transporter an der BHS darstellt, der auch im Colon und in der Niere, zwei Geweben mit hohen Transportaktivitäten für viele Substanzen, vorkommt.

5 **Beispiel 9: Identifizierung von 5E7/TSC-22**

Der subtraktive Klon 5E7 zeigte im differentiellen Screen mit der *forward probe* im Vergleich zur *reverse probe* ein >5mal stärkeres Signal und wurde somit zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenz des Klons 5E7 ist als SEQ ID NO 54 aufgeführt.

- 10 Anhand dieser Sequenz konnte 5E7 eindeutig als *transforming growth factor beta-stimulated protein* TSC-22 identifiziert werden.

- Der Klon 5E7 repräsentiert das 3' Ende des Transkriptes TSC-22. Um die vollständige cDNA aus Schwein zu erhalten, wurde
15 eine 5'RACE-PCR durchgeführt. Das Produkt dieser PCR wurde kloniert und sequenziert. Die vollständige cDNA-Sequenz von TSC-22 aus Schwein ist als SEQ ID NO 55 aufgeführt, die kodierende Region liegt hier von Position 243-677. Das hierzu korrespondierende Protein ist als SEQ ID NO 56 aufgeführt. Das
20 porcine Protein ist 100 % identisch zu dem bereits bekannten humanen Protein TSC-22, was für eine besondere Bedeutung dieses Proteins spricht.

- Es wurde wie beschrieben ein Expressionsmuster für 5E7 durch Northern-Blot Analyse erstellt, als Sonde diente hierbei der
25 subtraktive Klon 5E7 (vgl. Figur 34).

Das Experiment zeigt die stärkere Expression von TSC-22 in BMEC im Vergleich zum Gesamthirn und zeigt somit die Spezifität für die Blut-Hirn-Schranke. Diese Expression in BMEC bzw. an der BHS ist bisher nicht beschrieben.

Um Hinweise auf eine mögliche Rolle von TSC-22 an der BHS zu erhalten, wurde das Expressionsmuster in kultivierten BMEC im Vergleich zu bekannten BHS-Markern bzw. 18S rRNA untersucht. Für die quantitative PCR wurden die Primer 5E7.1 (5' AAG AGG TGT GGC TTG TCT TTT A 3', SEQ ID NO 57) und 5E7.1R (5' TTT TTC AAA GTA TTC AAC CAG CTC 3', SEQ ID NO 58) benutzt. Das Ergebnis ist in Figur 35 gezeigt.

Die Daten zeigen eine schnelle Abnahme der Expression von TSC-22 in kultivierten BMEC und weisen somit eindeutig auf eine Rolle von TSC-22 an der BHS hin. Die starke Expressionsabnahme in kultivierten BMEC spricht dafür, dass TSC-22 mit dem Differenzierungszustand der Zellen in Zusammenhang steht.

Auf die gleiche Weise wurde die Expression von TSC-22 in BMEC unter Ischämie untersucht. Das Ergebnis ist in Figur 36 gezeigt.

Das Target TSC-22 ist in BMEC unter Ischämie stark in seiner Expression vermindert. Dies belegt eine mögliche funktionelle Rolle von TSC-22 bei Krankheiten, die mit ischämischen Bedingungen verbunden sind. Hierzu gehören Schlaganfall, Herzinfarkt (TSC-22 ist auch im Herzen stark exprimiert, s. Fig. 34) und die Bedingungen in einem Tumor, z.B. beim Glioblastom. Die Untersuchung der Expression von TSC-22 lässt sich deshalb auch als diagnostischer Marker bei diesen Erkrankungen verwenden. Basierend auf diesen Erkenntnissen können Therapiekonzepte gegen Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion der BHS einhergehen, entwickelt werden.

TSC-22 gehört zu der Klasse von Transkriptionsfaktoren mit *leucine zipper* (Kester et al., 1999). Es ist an der Signaltransduktion u.a. von TGF-beta beteiligt (Kawamata et al., 1998) und spielt somit eine Rolle beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung.

Daraus ergibt sich, dass TSC-22 mit für den Differenzierungs-
zustand von BMEC verantwortlich ist.

Literatur:

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990): „Basic local alignment search tool“, *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

- 5 Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979): "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1522.

Cserzo et al. (1997): "Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the dense alignment
10 surface method", *Prot. Eng.* **10**: 673-676.

Deleersnijder, W., Hong, G., Cortvrindt, R., Poirier, C., Tylzanowski, P., Pittois, K., Van Marck, E., and Merregaert, J. (1996): „Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning
15 and characterization of a gene belonging to a novel multigene family of integral membrane proteins“, *J. Biol. Chem.* **271**, 19475-19482.

Kawamata, H., Nakashiro, K., Uchida, D., Hino, S., Omotehara, F., Yoshida, H., and Sato M. (1998): „Induction of TSC-22 by
20 treatment with a new anti-cancer drug, vesnarinone, in a human salivary gland cancer cell“, *Brit. J. Cancer* **77**: 71-78.

Kester, H.A., Blanchelot, C., den Hertog, J., van der Saag, P.T., and van der Burg, B. (1999): „Transforming growth factor- β -stimulated clone-22 is a member of a family of leucine
25 zipper proteins that can homo- and hetrodimerize and has transcriptional repressor activity“, *J. Biol. Chem.* **274**: 27439-27447.

Li, J.Y., Boado, R.J., and Pardridge, W.M. (2001): „Blood-brain barrier genomics“, *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* **21**, 61-68.

Marvin, K.W., Fujimoto, W., Jetten, A.M. (1995): „Identification and characterization of a novel squamous cell-associated gene related to PMP22“, *J. Biol. Chem.* **270**, 28910-28916.

Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988): „Improved Tools for Biological Sequence Analysis“, *PNAS* **85**, 2444-2448.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989)..

Sebald, E., Krueger, R., King, L.M., Cohn, D.H., and Krakow, D. (2003): „Isolation of a new member of the ADP-ribosylation like factor gene family, ARL8, from a cartilage cDNA library“, *Gene* **311**: 147-151.

Shevchenko A., Sunyaev S., Loboda A., Shevchenko A., Bork P., Ens W. and Standing K.G. (2001); „Charting the Proteomes of Organisms with Unsequenced Genomes by MALDI-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and BLAST Homology Searching“, *Anal. Chem.* **73**: 1917-1926.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 5
- a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt,
- 10
- b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lyse-puffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält,
- 15
- c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt,
- d) eine subtraktive cDNA-Bank aus den Hirnkapillar-Endothelzellen und einem Subtraktionsgewebe herstellt,
- e) eine cDNA-Subtraktion mittels einer oder mehrerer differentieller Hybridisierungen durchführt,
- 20
- f) Klone aus der subtraktiven cDNA-Bank durch differentielle Hybridisierung hinsichtlich ihrer jeweiligen Expression verifiziert,
- g) zu den BHS-spezifischen Klonen aus der subtraktiven cDNA-Bank die cDNA-Sequenz ergänzt und
- 25
- h) das Expressionsmuster der untersuchten Klone zwischen frischen und kultivierten Hirnkapillar-Endothelzellen

vergleicht und so die Anwesenheit BHS-spezifischer Proteine oder Fragmente davon identifiziert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t, dass der Lysepuffer in Stufe b) die
5 folgende Zusammensetzung besitzt:

Na^+	30,0 mM bis	60,0 mM
K^+	5,0 mM bis	7,5 mM
NH_4^+	80,0 mM bis	100,0 mM
Ca^{2+}	1,0 mM bis	2,0 mM
Mg^{2+}	6,0 mM bis	9,0 mM
Cl^-	125,0 mM bis	175,0 mM
HCO_3^-	4,5 mM bis	6,5 mM
H_2PO_4^-	0,5 mM bis	2,5 mM
SO_4^{2-}	0,3 mM bis	0,6 mM
HPO_4^{2-}	0,4 mM bis	0,7 mM
Glukose	1,5 mM bis	3,0 mM

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t, dass der Lysepuffer die folgende Zu-
10 sammensetzung besitzt:

NaCl	30 mM	bis	50 mM
KCl	4,5 mM	bis	5,5 mM
NH ₄ Cl	80 mM	bis	100 mM
CaCl ₂	1,0 mM	bis	2,0 mM
MgCl ₂	0,6 mM	bis	0,8 mM
MgSO ₄	0,3 mM	bis	0,6 mM
NaHCO ₃	4,5 mM	bis	6,5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,2 mM	bis	0,45 mM
Na ₂ HPO ₄	0,4 mM	bis	0,65 mM
KH ₂ PO ₄	0,1 mM	bis	0,15 mM
Glucose	1,5 mM	bis	3,0 mM

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Subtraktionsgewebe in Stufe f) Aortenendothelzellen sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man die vollständige cDNA-Sequenz in Stufe i) durch Durchmustern von cDNA-Banken und RACE-PCR erstellt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Hirnkapillar-Endothelzellen aus dem Menschen oder dem Schwein stammen.
7. Protein mit BHS-Spezifität oder ein Fragment davon, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Protein nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz ausgewählt aus

SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:19, oder SEQ ID NO:53 besitzt.

9. Verfahren zur Identifizierung der Anwesenheit eines BHS-spezifischen Proteins oder Fragments davon in Hirnkapillar-Endothelzellen, dadurch gekennzeichnet, dass man
- a) frisch aus dem Gehirn isolierte Hirnkapillar-Endothelzellen durch enzymatischen Aufschluss in üblicher Weise vorreinigt,
 - 10 b) den in Stufe a) erhaltenen Aufschluss mit einem Lyse-puffer behandelt, der vorhandene Erythrozyten und apoptotische Zellen im Wesentlichen zerstört und wenigstens 70% der Hirnkapillar-Endothelzellen in vitaler Form erhält,
 - 15 c) gegebenenfalls das in Stufe b) erhaltene Produkt weiter aufreinigt,
 - d) das in Stufe c) erhaltene Produkt in einem geeigneten Puffer solubilisiert,
 - e) eine isoelektrische Fokussierung durchführt,
 - 20 f) die Proben aus der isoelektrischen Fokussierung in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht auf-trennt,
 - g) differentielle Spots identifiziert und isoliert,
 - h) mit dem Isolat von g) eine massenspektrometrische Analyse durchführt, und
 - 25 i) hiervon eine Auswertung mittels gezielter Datenbank-analyse vornimmt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Lysepuffer in Stufe b) die folgende Zusammensetzung besitzt:

Na ⁺	30,0 mM bis	60,0 mM
K ⁺	5,0 mM bis	7,5 mM
NH ₄ ⁺	80,0 mM bis	100,0 mM
Ca ²⁺	1,0 mM bis	2,0 mM
Mg ²⁺	6,0 mM bis	9,0 mM
Cl ⁻	125,0 mM bis	175,0 mM
HCO ₃ ⁻	4,5 mM bis	6,5 mM
H ₂ PO ₄ ⁻	0,5 mM bis	2,5 mM
SO ₄ ²⁻	0,3 mM bis	0,6 mM
HPO ₄ ²⁻	0,4 mM bis	0,7 mM
Glukose	1,5 mM bis	3,0 mM

5

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Lysepuffer die folgende Zusammensetzung besitzt:

NaCl	30 mM	bis	50 mM
KCl	4,5 mM	bis	5,5 mM
NH ₄ Cl	80 mM	bis	100 mM

CaCl ₂	1,0 mM	bis	2,0 mM
MgCl ₂	0,6 mM	bis	0,8 mM
MgSO ₄	0,3 mM	bis	0,6 mM
NaHCO ₃	4,5 mM	bis	6,5 mM
NaH ₂ PO ₄	0,2 mM	bis	0,45 mM
Na ₂ HPO ₄	0,4 mM	bis	0,65 mM
KH ₂ PO ₄	0,1 mM	bis	0,15 mM
Glucose	1,5 mM	bis	3,0 mM

12. Protein mit BHS-Spezifität oder ein Fragment davon, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11.
- 5 13. Protein nach Anspruch 12, dadurch g e k e n n -
z e i c h n e t, dass es eine Sequenz ausgewählt aus
SEQ ID NO 23, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:33 besitzt.
- 10 14. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 7 bis
8 oder 12 bis 13 zur Herstellung eines Medikaments zum
Transport von Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke.
- 15 15. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 7 bis
8 oder 12 bis 13 zur Herstellung eines Mittels oder Medi-
kaments zur Diagnose oder Therapie von Erkrankungen, die
auf einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen.
16. Mittel zur Diagnose von Erkrankungen, die auf einer Dys-
funktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen, dadurch g e -
k e n n z e i c h n e t, dass es ein Protein nach einem
der Ansprüche 7 bis 8 oder 12 bis 13 umfasst.

17. Mittel zur Therapie von Erkrankungen, die auf einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke beruhen, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Protein nach einem der Ansprüche 7 bis 8 oder 12 bis 13 umfasst.
- 5 18. Verwendung einer oder mehrerer DNA-Sequenz(en) ausgewählt aus SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, zur Herstellung eines Mittels
10 zur Diagnose von Krankheiten, die mit ischämischen Bedingungen verbunden sind.
19. Verwendung nach Anspruch 18 zur Diagnose von Schlaganfall, Herzinfarkt oder tumorassoziierten Zuständen.
- 15 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Diagnose über die Kontrolle der Expression der von den genannten DNA-Sequenzen codierten Proteine erfolgt.

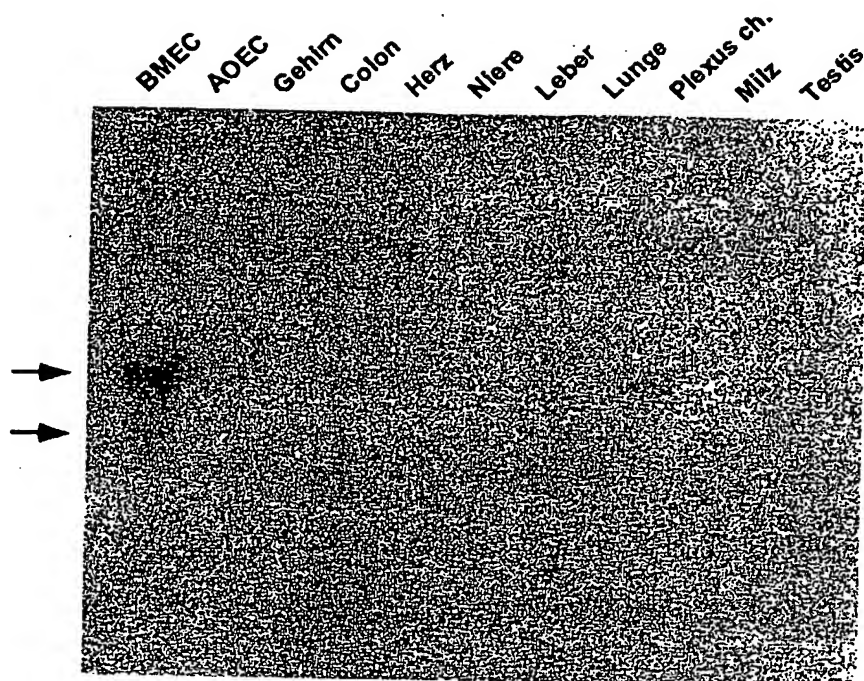


Fig. 1a

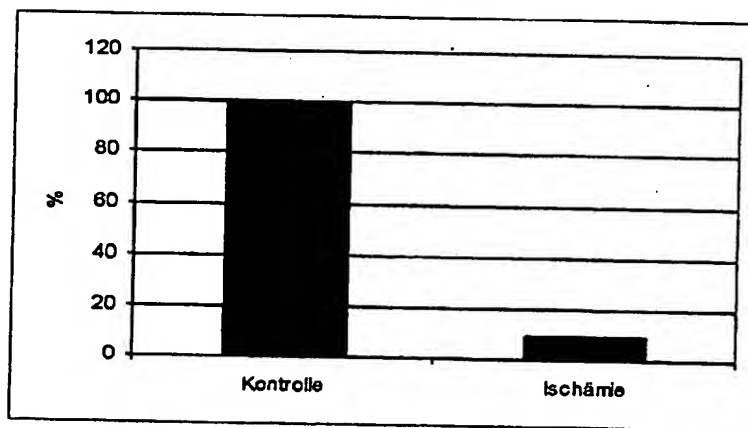


Fig. 1b

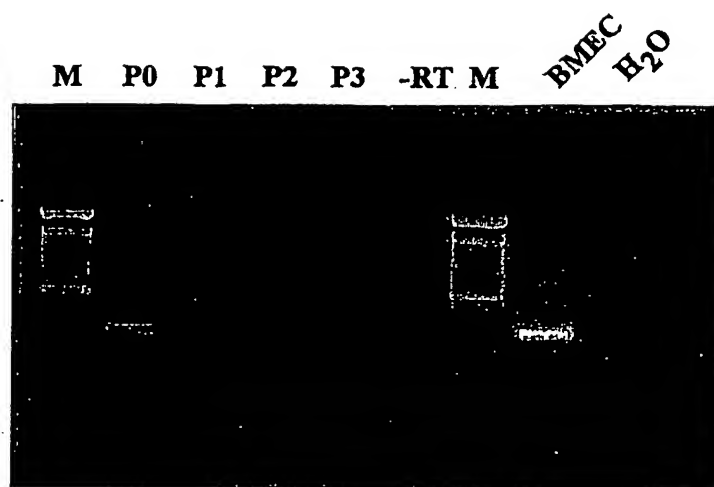


Fig. 2

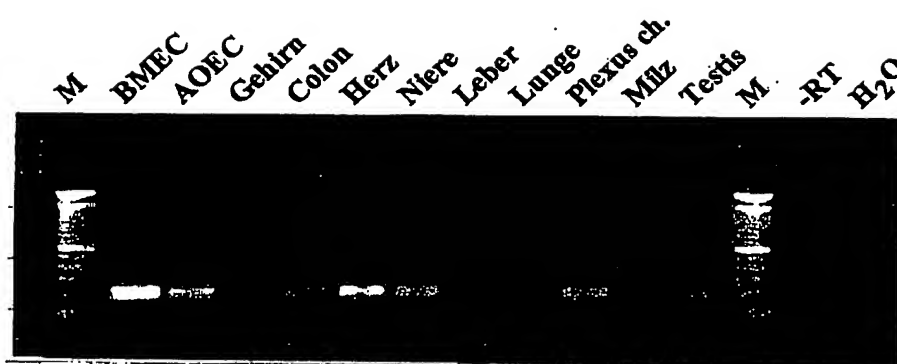


Fig. 3

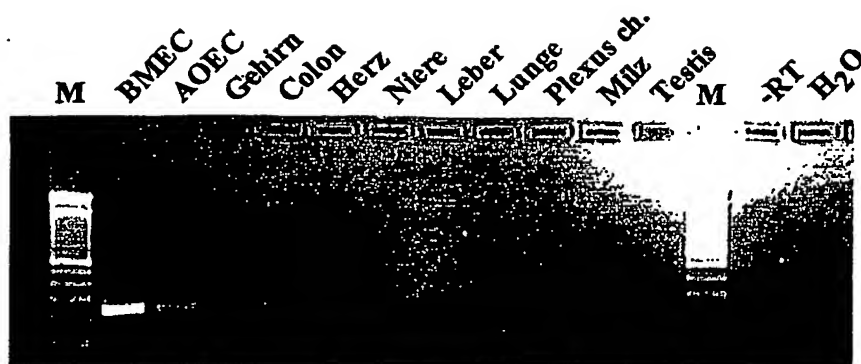


Fig. 4

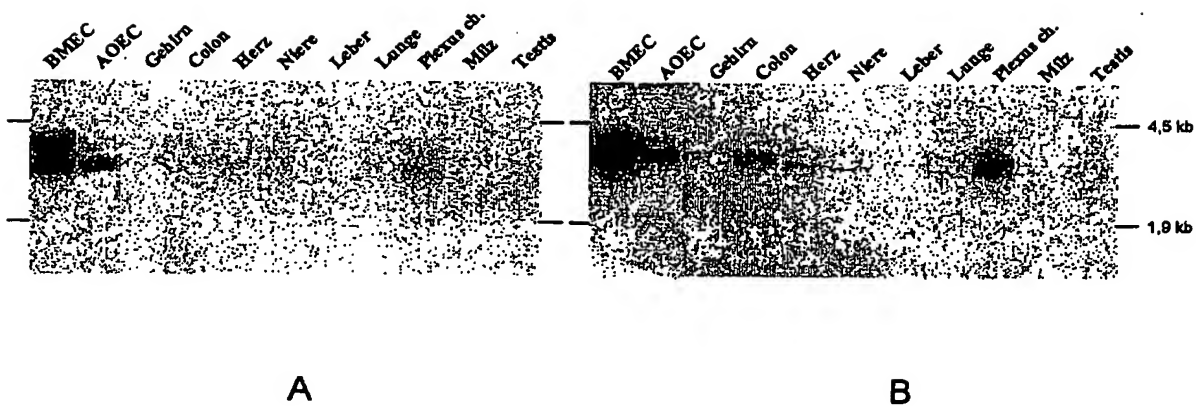


Fig. 5

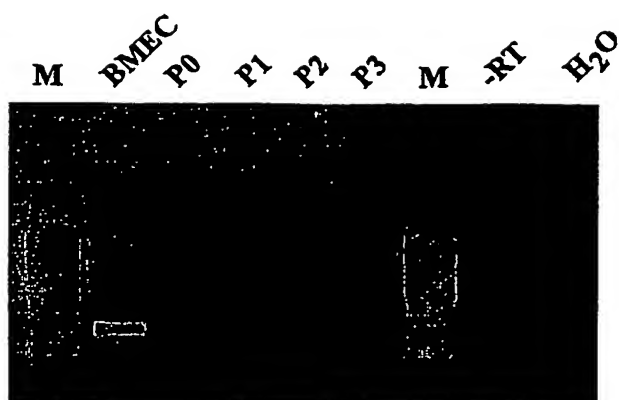


Fig. 8

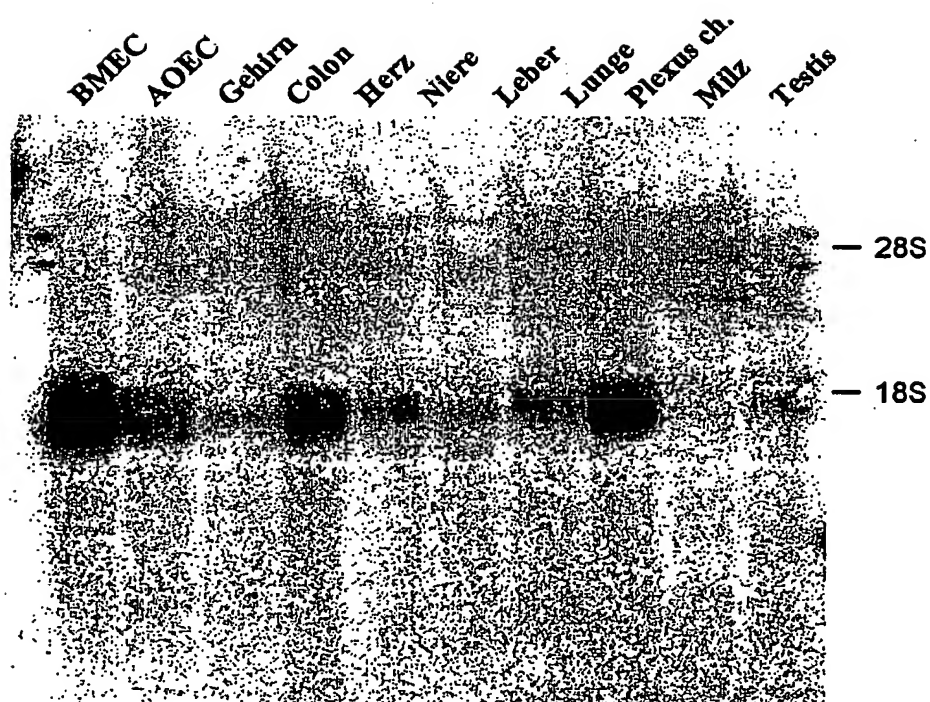


Fig. 9

Mensch	M--AARTGHTALRRVVGCRPKSATAAG----AQAPVRNGRYLASCGILMSRTLPLHTSI	54
Schwein	MFVAARTGQRTLKVVSGCRPKSATATGVPAPAQGPFRNIRYLASCGILMNRTLPLHSSF	60
Maus	MIMAARTSQRALARVASGCHPKSTTVTEAP--ARGSARDVRHLAACGVLINRTLPPCAAV	58
	* ****:::* :*.***:***:*.: *:. . *: *:*:*:*:*:.**** :..	
Mensch	LPKEICARTFFKITAPLINKRKEYSERRILGYSMQEMYDVVSGVEDYKHFPWCKKSDVI	114
Schwein	LPKEMYARTFFRIAAPLINKRKEYSERRIIGYSMQEMYDVVSGMEDYKHFPWCKKSDVI	120
Maus	LPKEICARTFFRISAPLVNKRKEYSERRILGYSMQEMYDVVSGMEDYQHFPWCKKSDII	118
	****: *****:*.***:*****:*****:*****:*****:*****:*	
Mensch	SKRSGYCKTRLEIGFPPVLERYTSVVTLVKPHLVKASCTDGRLENHLETIWRFSPLPGY	174
Schwein	SRRSGYCKTRLEIGFPPVLERYTSVVTLVKPHLVKASCADGKLENHLETVWRFSPLPGY	180
Maus	SRRSGYCKTRLEVGFPPVLERYTSIVTLVKPHLVKASCTDGKLENHLETIWRFSPLPGY	178
	*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Mensch	PRTCTLDFSISFEFRSLLHSQLATLFFDEVVKQMVAAFERRACKLYGPETNIPRELMLHE	234
Schwein	PRTCTLDFSISFEFRSLLHSQLATLFFDEVVKQMVAAFERRACKLYGPETSIPRELMLHE	240
Maus	PRTCTLDFSISFEFRSLLHSQLATLFFDEVVKQMVAAFERRACKLYGPETNIPRELMLHE	238
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Mensch	VHHT	238
Schwein	VHHT	244
Maus	IHHT	242
	:***	

Fig. 10

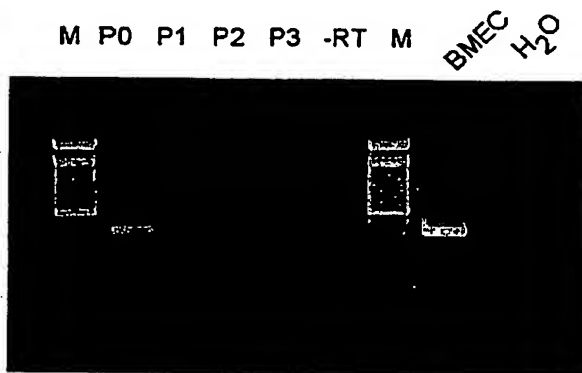


Fig. 11

MGNQVEKLTH	LSYKEVPTAD	<u>PTGVDRDDGP</u>	RIGVSYIFSN	DDEDVEPQPP
PQGPDGGGLP	DGGDGPPPPQ	PQPYDPR <u>LHE</u>	<u>VECSVFYRDE</u>	<u>CIYQKSFAPG</u>
<u>SAALSTYTPE</u>	<u>NLLNKCKPGD</u>	LVEFVSQAQY	PHWAVYVGNF	QVVHLHRLEV
INSFLTDASQ	GRRGRV <u>VNDL</u>	<u>YRYKPLSSA</u>	VVRNALAHVG	AKERELSWRN
<u>SESEFAAWCRY</u>	GKREFKIGGE	<u>LRIGKQPYRL</u>	<u>QIQLSAQRSH</u>	<u>TLEFQSLEDL</u>
<u>IMEKRRNDQI</u>	GRAAVLQELA	THLHPAEPEE	GDSNVARTTP	PPGRPPAPSS
EEEDGEAVAH				

Fig. 12

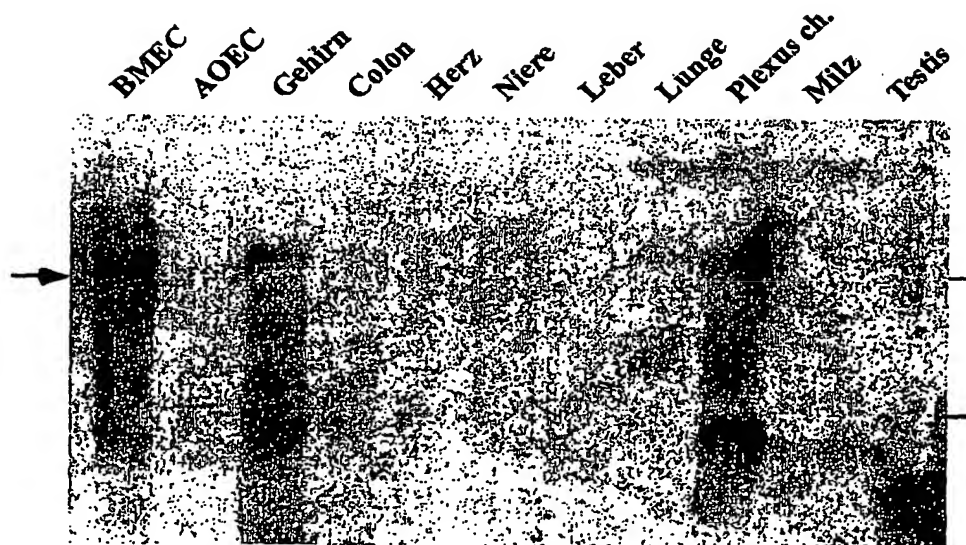


Fig. 13

Fig. 14

Fig. 15

```

MGNQVEKLTHLSYKEVPTADPTGVDRDDGPRIGVSYIFSNDDEDVEPQPP 50
-----
PQGPDDGGGLPDGGDGPPPPQPPYDPRLEHEVECSVFYRDECIYQKSFAPG 100
+++++
SAALSTYTPENLLNKCKPGDLVEFVSQAQYPHWAVYVGNFQVVHLHRLEV 150
-----
INSFLTDASQGRGRVVNDLYRYKPLSSSAVVRNALAHVGAKERELSWRN 200
SESFAAWCRYGKREFKIGGELRIGKQPYRLQIQLSAQRSHTLEFQSLEDL 250
IMEKRRNDQIGRAAVLQELATHLHPAEPEEGDSNVARTTPPPGRPPAPSS 300
+++++
EEEDGEAVAH 310

```

+++++

+++++

possible PEST sequences
poor PEST sequences

Fig. 16

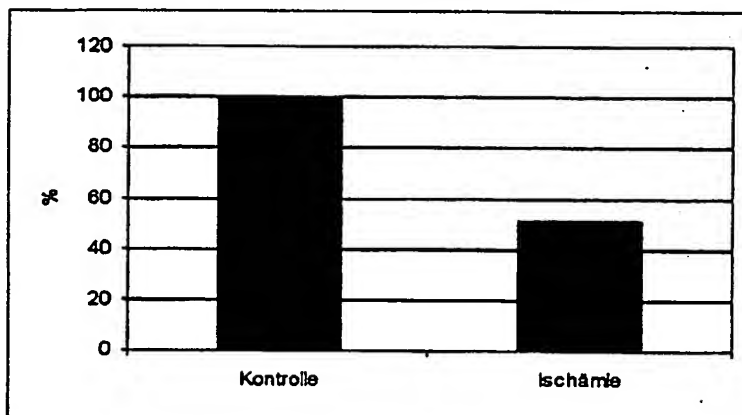


Fig. 17

MAALAPLPPL PAQLKSIQHH LRTAQEHDKR DPVVAYYCRL YAMQTGMKID
SKTPECRKFL SKLMDQLEAL KKQLGDNEAI TQEIIVGCAHL ENYALKMFLY
ADNEDRAGR HKNMISFYT ASLLIDVITV FGELTDENVK HRKYARWKAT
 YIHNCLKNGE TPQAGPVGIE EDNDIEENED AGAASLPTQP TQPSSSSTYD
 PSNMPSGNYT GIQIPPGAHA PANTPAEVPH STGVASNTIQ PTPQTIPAI
 PALFNTISQG DVRLTPEDFA RAQKYCKYAG SALQYEDVST AVQNLQKALK
LLTTGRE

Fig. 18

Mensch	MAALAPLPPLPAQLKSIQHHLRTAQEHDKRDPVVAYYCRLYAMQTGMKIDSKTPECRKFL	60
Maus	MAALAPLPPLPAQFKSIQHHLRTAQEHDKRDPVVAYYCRLYAMQTGMKIDSKTPECRKFL	60
	*****:*****	
Mensch	SKLMDQLEALKKQLGDNEAITQEIIVGCAHLENYALKMFLYADNEDRAGRHKNMISFYT	120
Maus	SKLMDQLEALKKQLGDNEAVTQEIIVGCAHLENYALKMFLYADNEDRAGRHKNMISFYT	120
	*****:*****	
Mensch	ASLLIDVITVFGELTDENVKHKRYARWKATYIHNCLKNGETPQAGPVGIEEDNDIEENED	180
Maus	ASLLIDVITVFGELTDENVKHKRYARWKATYIHNCLKNGETPQAGPVGIEEENDVEENED	180
	*****:*****	
Mensch	AGAASLPTQPTQPSSSSTYDPSNMPSGNYTGIQIPPGAHAHAPANTPAEVPHSTGVASNTIQ	240
Maus	VGATSLPTQPPQPSSSSAYDPSNLAPGSYSGIQIPPGAHAHAPANTPAEVPHSTGVTSNAVQ	240
	.**:	
Mensch	PTPQTIP---AIDPALFNTISQGDVRLTPEDFARAQKYCKYAGSALQYEDVSTAVQNLQK	297
Maus	PSPQTVPAAPAVDPDLY-TASQGDIRLTPEDFARAQKYCKYAGSALQYEDVGTAVQNLQK	299
	::*:* *:* *:* *:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:	
Mensch	ALKLLTTGRE	307
Maus	ALRLLTTGRE	309
	:*:*:	

Fig. 19

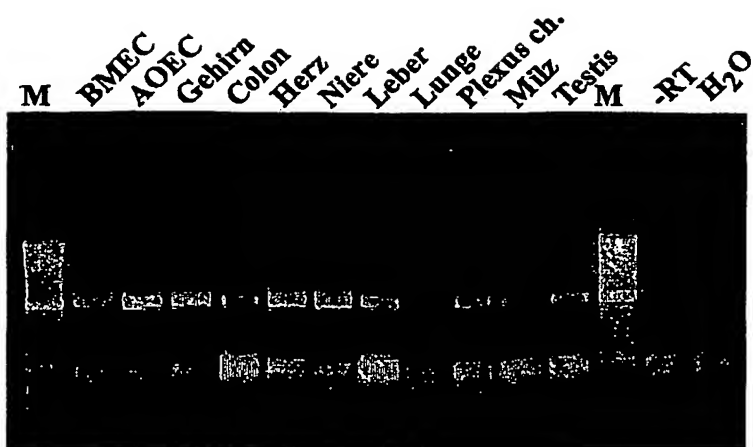


Fig. 20

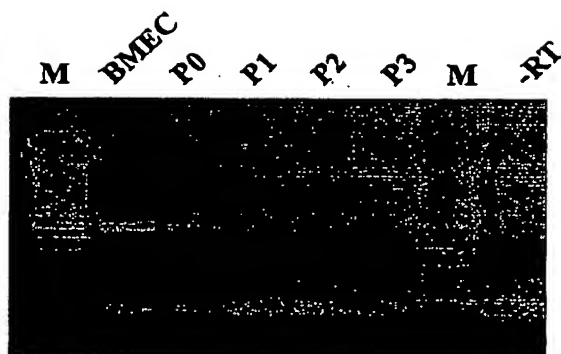


Fig. 21

<u>MAAPEPLRPR</u>	LCRLVRGEQG	YGFHLHGEKG	<u>RRGQFIRRV</u>	PGSPAEEAAL
AGDRLVEVNG	<u>VNVEGETHHQ</u>	<u>VVQRIKAVEG</u>	<u>QTRLLVVDQE</u>	<u>TDEELRRRQL</u>
TCTEEMAQRG	LPPAHDPWEP	KPDWAHTGSH	SSEAGKKDVS	GPLRELRPRL
CHLRKGPQGY	<u>GPNLHSDKSR</u>	<u>PGQYIRSVD</u>	GSPAARSGLR	AQDR <u>LIEVNG</u>
<u>ONVEGLRHAE</u>	<u>VVASIKARE</u>	EARLLVVDPE	TDEHFKRLRV	TPTEEHVEGP
LPSPVTNGTS	PAQLNGGSAC	SSRDLPGSD	KDTEGSAWK	<u>QDPFQESGLH</u>
<u>LSPTAAEAR</u>	<u>RLEPCESTSA</u>	<u>RHRWTGTGSV</u>	KSSATSEPLP	ACLGTLGPLP
HGPWASACPE	LPQPQWTGGW	SCHCPEISPS	PGEPPSCPCP	PGTGGLWQQD
RGRETQRCER	ESETETERER	ERHRERQRES	ERARGSRGAR	AFAALPGPAD

Fig. 22

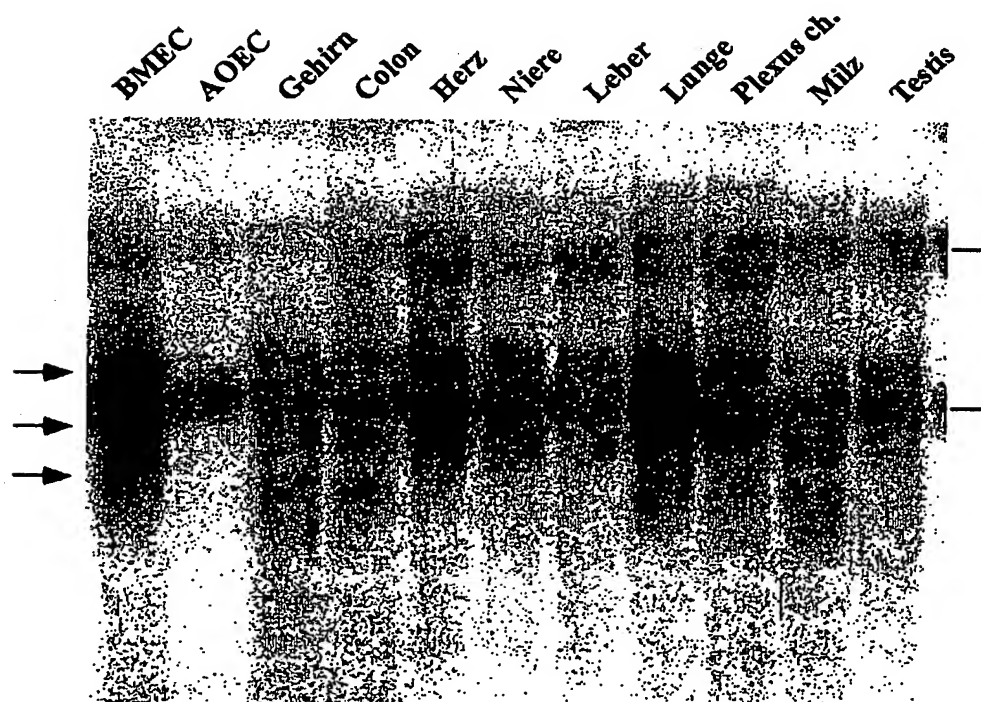


Fig. 23

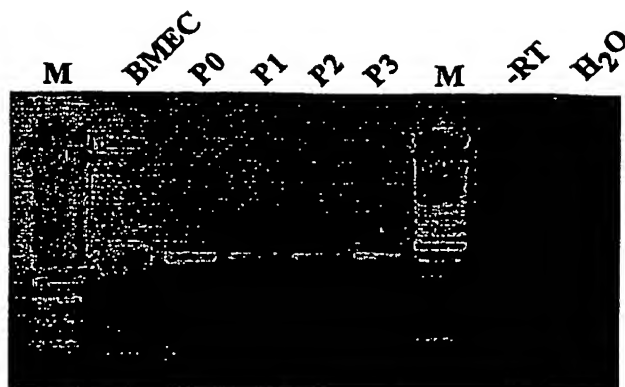


Fig. 24

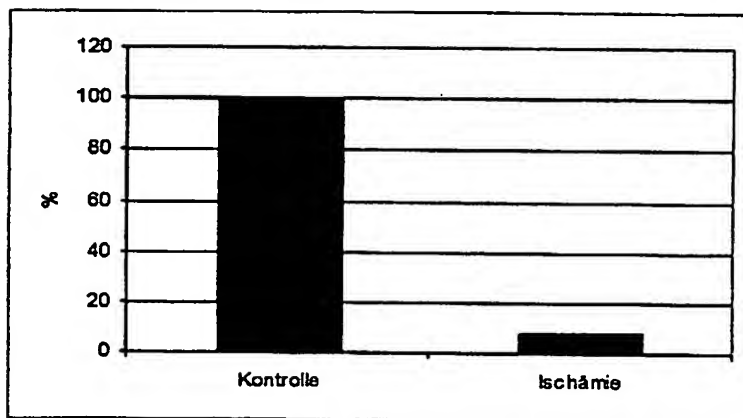


Fig. 25

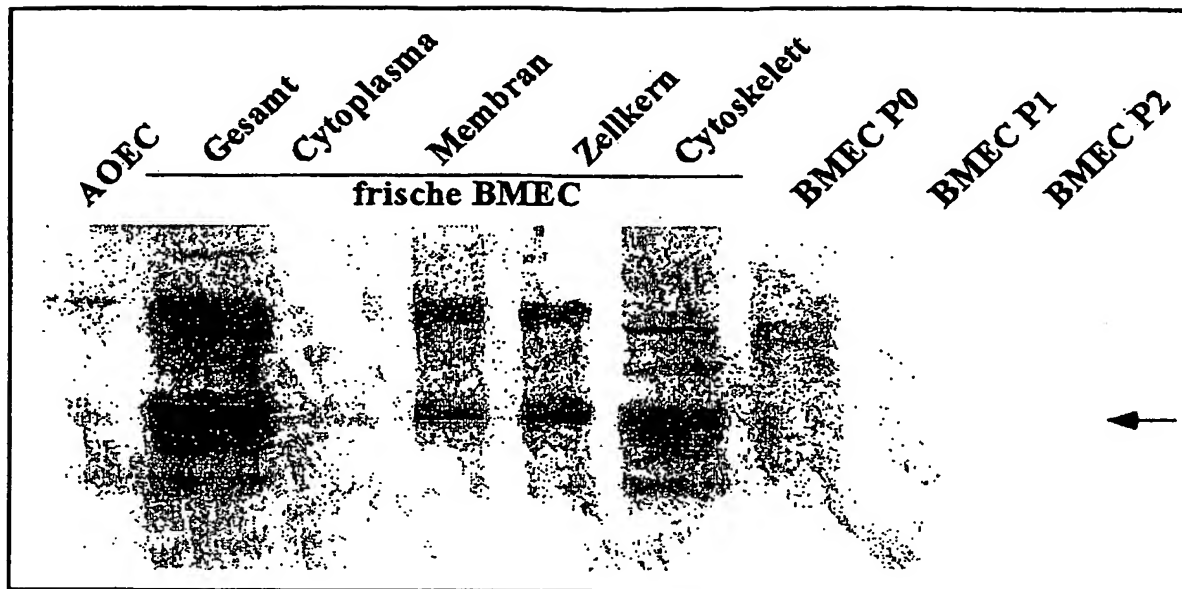


Fig. 26

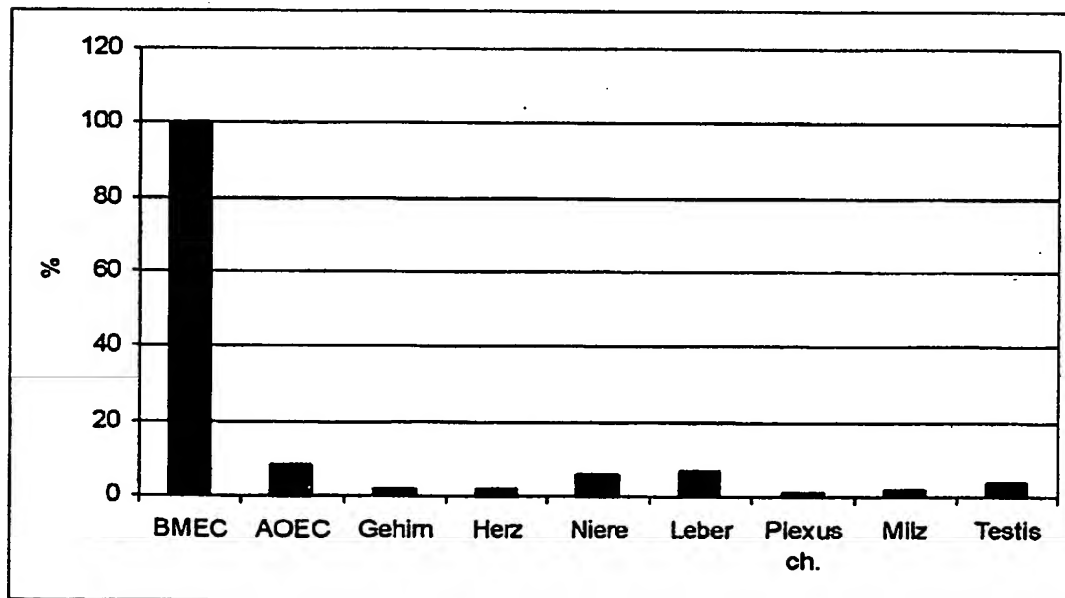


Fig. 27

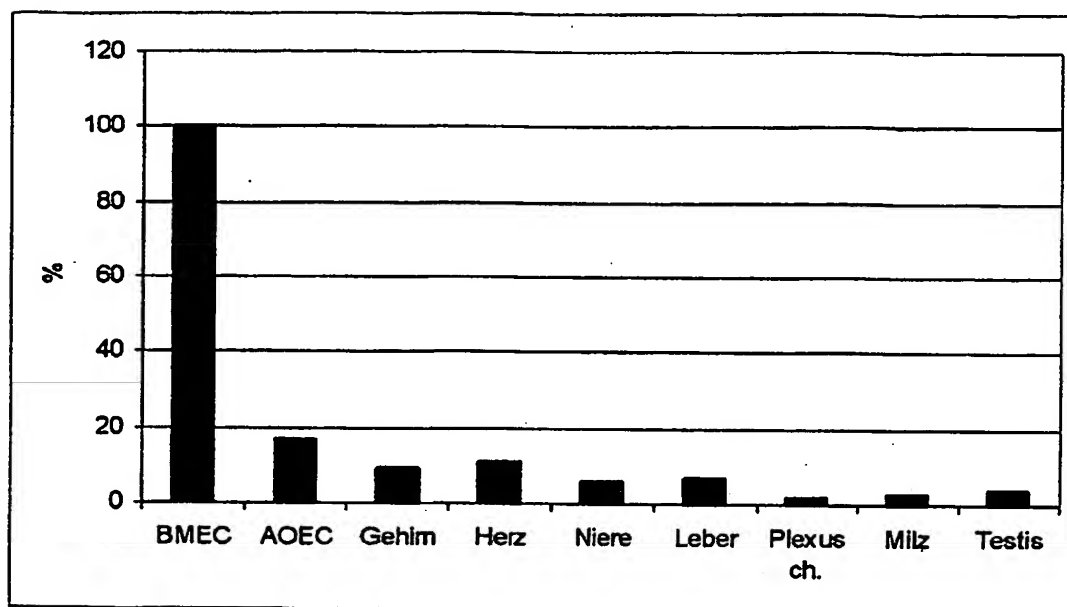


Fig. 28

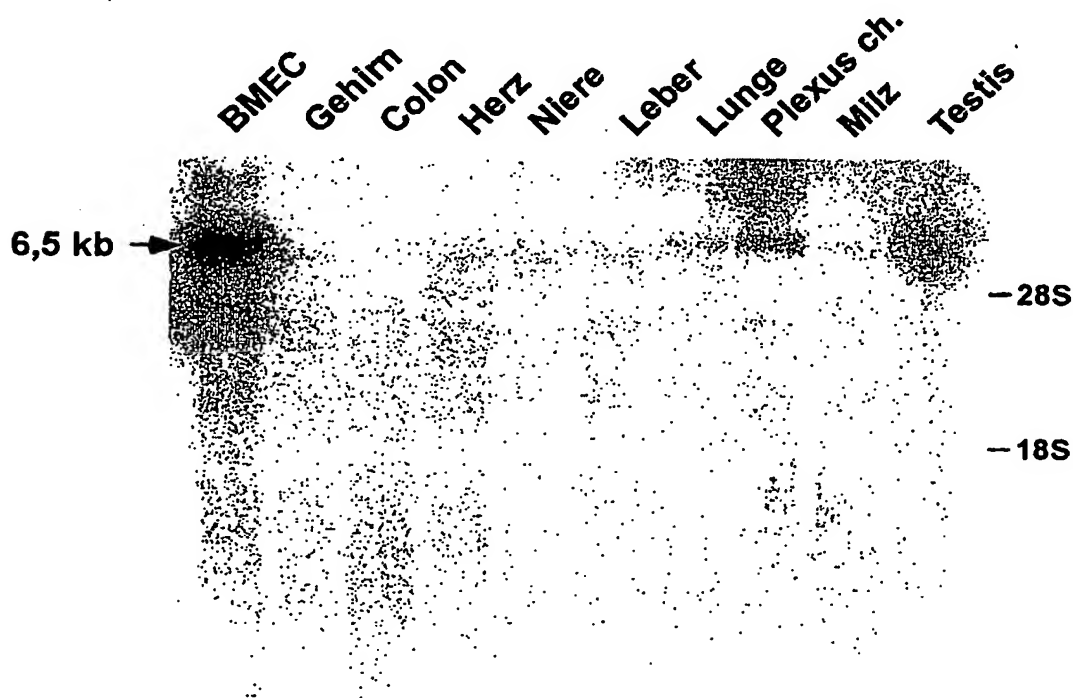


Fig. 29

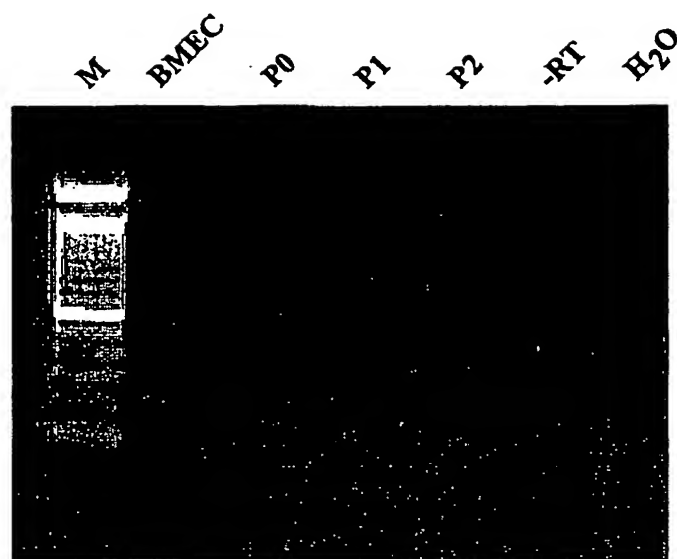


Fig. 30

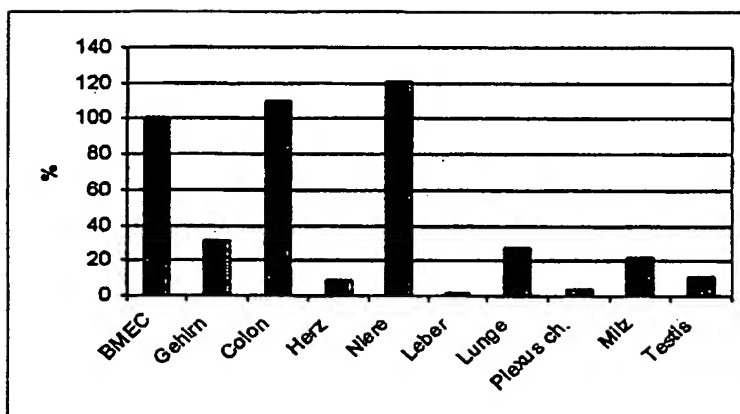


Fig. 31

HSNOV1: 48 MSLCICGTAITSQYLAERYKVNTFMLQSFINYCLLFliYTMMLAFRSGSDNLLVILKRK 107
MSLCICGTAITSQYLAE+YKVNTFMLQSFINYCLLFliYTMMLAF+SG++NLL IILK+K
PNOV1: 1 MSLCICGTAITSQYLAERYKVNTFMLQSFINYCLLFliYTMMLAFQSGNNNLLCILKKK 60

HSNOV1: 108 WWKYILLGLADVEANYVIVRAYQYTTLTsvQLLDCFGIPVLMALSWFILHARYRVIHfIA 167
WWKYILLGLADVEANY+IVRAYQYTTLTsvQLLDCFGIPVLMALSWFIL+ARYRVIHfIA
PNOV1: 61 WWKYILLGLADVEANYLIVRAYQYTTLTsvQLLDCFGIPVLMALSWFilyARYRVIHfIA 120

HSNOV1: 168 VAVCLLGVGTMVGADILAGREDNSGSDVLIGDILVLLGASLYAISNVCEEYIVKKLSRQE 227
VAVCLLGVGTMVGADILAGREDNSGSDVLIGD+LVLLGASLYA+SNVCEEYIVKKLSRQE
PNOV1: 121 VAVCLLGVGTMVGADILAGREDNSGSDVLIGDVLVLLGASLYAVSNVCEEYIVKKLSRQE 180

HSNOV1: 228 FLGMVGLFGTIISGIQLLIVEYKDIAIHWDWKIALLFVAFALCMFCLYSFMPLVIKvTS 287
FLGMVGLFGTIISGIQLLIVEYKDIAIHWDWKIALLFVAFALCMFCLYSFMPLVIKvTS
PNOV1: 181 FLGMVGLFGTIISGIQLLIVEYKDIAIHWDWKIALLFVAFALCMFCLYSFMPLVIKvTS 240

HSNOV1: 288 ATSVNLGILTADLYSLFVGLFLEGYKFSGLYILSFTVIMVGfILYCSTPTrTAEPaESSV 347
ATSVNLGILTADLYSLF GLFLEGYKFSGLYILSF VIMVGfILYCSTPTrTAEPaESSV
PNOV1: 241 ATSVNLGILTADLYSLFFGLFLEGYKFSGLYILSFAVIMVGfILYCSTPTrTAEPaESSV 300

HSNOV1: 348 -PPVTSIGIDNLGLKLEENLQETHSAVL 374
PPVTSIGIDNLGLKLEENL ETHS L
PNOV1: 301 PPPVTSIGIDNLGLKLEENLPETHSVAL 328

Fig. 32

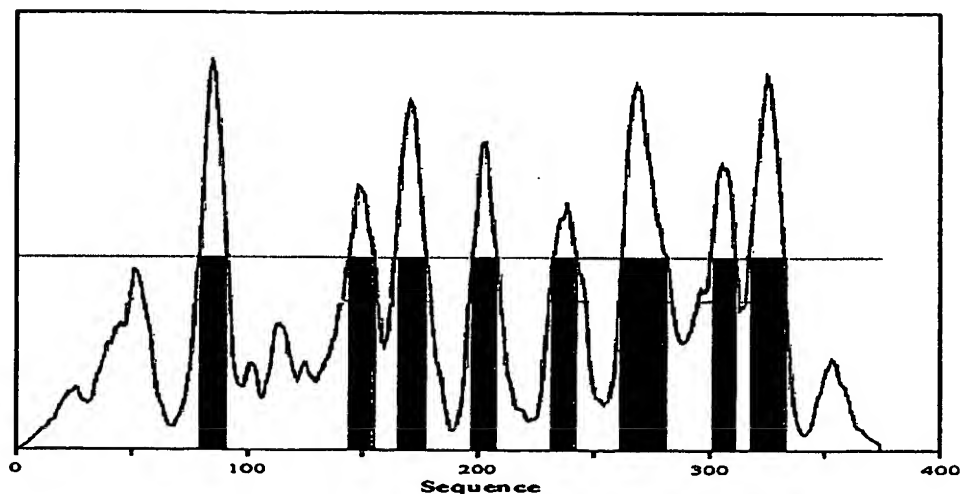


Fig. 33

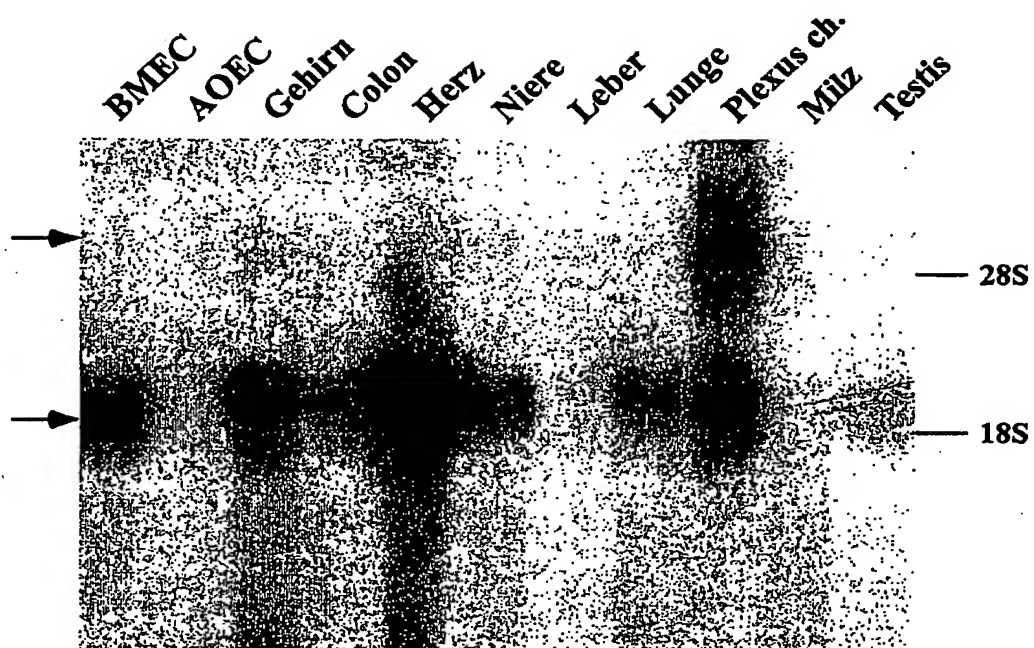


Fig. 34

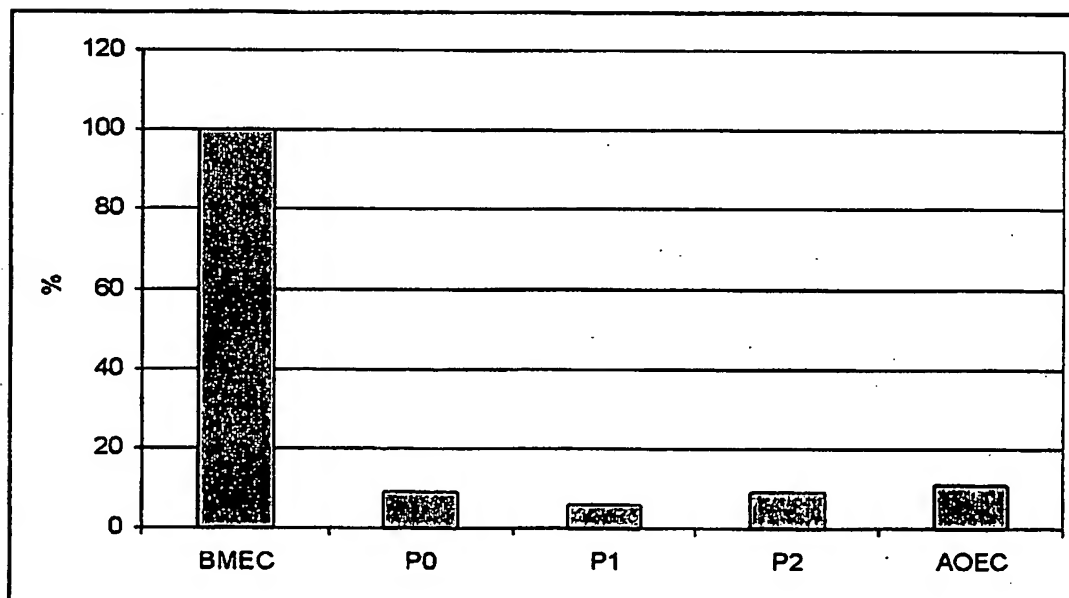


Fig. 35

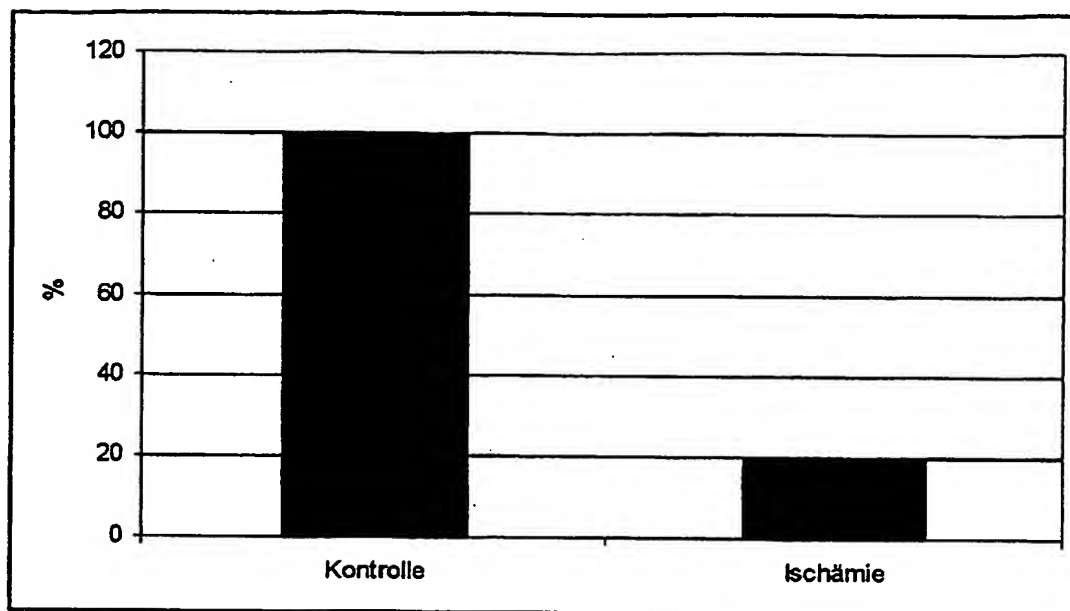


Fig. 36

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Explora GmbH

5 <120> Verfahren zur Identifizierung BHS-spezifischer Proteine
und Fragmente davon

<130> 12186WO

10 <140>

<141>

<160> 58

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 323

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S129
aus BMEC aus Schweinehirn

25

<400> 1

ctgcagccga ggacaacact gattcgagcc gtgacctacc ggccgcggga attcgattta 60
tggtgaaaat cgccttcaat acaccgcgag cggtgcaaaa agaggaggcg cagcaagacg 120
tggaggccct cgtaagccat acggtccgtg ctgagatcct gactggcaag gaactccaag 180
30 ttgccactaa ggaaaaagag ggcttctctg ggagatgcat gcttactctc gtaggccttt 240
ccttcattctt ggcaggactt attgttggtg gagcctgcat ttacaagtac ttcatgccca 300
agagtaccat actaccatgg aga 323

35 <210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

40 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 2

acctccattg ttatgcctcc ta

22

45

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

50 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

55 <400> 3

gttgctctc actcttgaca ga

22

<210> 4

<211> 1598
 <212> DNA
 <213> Schwein

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (119)..(910)

<400> 4

```

10 gcggccgcta gcataaagaa ggtgattcta agcctagcgc tatcttctcc tagtccagcc 60

   tgcagccgag gacaacactg attcgagccg tgacctaccg gccgcgggaa ttcgattt 118

   atg gtg aaa atc gcc ttc aat aca ccc gca gcg gtg caa aaa gag gag 166
15 Met Val Lys Ile Ala Phe Asn Thr Pro Ala Ala Val Gln Lys Glu Glu
   1           5           10           15

   gcg cag caa gac gtg gag gcc ctc gta agc cat acg gtc cgt gct cag 214
20 Ala Gln Gln Asp Val Glu Ala Leu Val Ser His Thr Val Arg Ala Gln
   20           25           30

   atc ctg act ggc aag gaa ctc caa gtt gcc act aag gaa aaa gag ggc 262
   Ile Leu Thr Gly Lys Glu Leu Gln Val Ala Thr Lys Glu Lys Glu Gly
   35           40           45

25   ttc tct ggg aga tgc atg ctt act ctc gta ggc ctt tcc ttc atc ttg 310
   Phe Ser Gly Arg Cys Met Leu Thr Leu Val Gly Leu Ser Phe Ile Leu
   50           55           60

30   gca gga ctt att gtt ggt gga gcc tgc att tac aag tac ttc atg ccc 358
   Ala Gly Leu Ile Val Gly Gly Ala Cys Ile Tyr Lys Tyr Phe Met Pro
   65           70           75           80

   aag agt acc atc tac cat gga gag atg tgc ttc ttt gat tct gcg gac 406
35 Lys Ser Thr Ile Tyr His Gly Glu Met Cys Phe Phe Asp Ser Ala Asp
   85           90           95

   cct gca aat ttc ctc caa gga gga gag ccc tac ttc ctg cct gtg atg 454
40 Pro Ala Asn Phe Leu Gln Gly Gly Glu Pro Tyr Phe Leu Pro Val Met
   100           105           110

   gaa gag gct gat att cgt gaa gat gac aac att gca atc att gat gtg 502
   Glu Glu Ala Asp Ile Arg Glu Asp Asp Asn Ile Ala Ile Ile Asp Val
   115           120           125

45   cct gtc ccc agt ttc tct gat agt gac cct gca gca att att cat gac 550
   Pro Val Pro Ser Phe Ser Asp Ser Asp Pro Ala Ala Ile Ile His Asp
   130           135           140

50   ttt gaa aag ggc atg act gct tac ctg gac ttg ctg ctg ggg aac tgc 598
   Phe Glu Lys Gly Met Thr Ala Tyr Leu Asp Leu Leu Leu Gly Asn Cys
   145           150           155           160

   tat ctg atg ccc ctc aat acc tcc att gtt atg cct cct aag tat ctc 646
55 Tyr Leu Met Pro Leu Asn Thr Ser Ile Val Met Pro Pro Lys Tyr Leu
   165           170           175

```

```

gtg gag ctc ttt ggc aaa ctg gca cgt ggc aaa tac ctc cct cac gct 694
Val Glu Leu Phe Gly Lys Leu Ala Arg Gly Lys Tyr Leu Pro His Ala
      180                      185                      190

5  tat gtg gtt cat gaa gac ctg gtt gct gtg gaa gag att cat gat gtt 742
Tyr Val Val His Glu Asp Leu Val Ala Val Glu Glu Ile His Asp Val
      195                      200                      205

10 agt aac ctt ggc atc ttt att tac caa ctt tgc aac aac cgc aag tct 790
Ser Asn Leu Gly Ile Phe Ile Tyr Gln Leu Cys Asn Asn Arg Lys Ser
      210                      215                      220

15 ttc cgc ctt cgt aga aga gac ctc ttg ctg ggt ttc aac aaa cgt gcc 838
Phe Arg Leu Arg Arg Arg Asp Leu Leu Leu Gly Phe Asn Lys Arg Ala
      225                      230                      235                      240

att gat aag tgc tgg aag att aga cac ttc ccc aat gaa ttt att gtt 886
Ile Asp Lys Cys Trp Lys Ile Arg His Phe Pro Asn Glu Phe Ile Val
      245                      250                      255

20 gag acc aag atc tgt caa gag tga gaggcaacag aaaaagagtg tacttagtaa 940
Glu Thr Lys Ile Cys Gln Glu
      260

25 taggaagtca aagatttaca atatgacttc.aatattaaag tgtgtaggac attcaagata 1000

tttactcatg catttcctct attgcttata cttaaaaaaa agaaagaaaa taaaaactac 1060

taaccattgc aaaaaaaaaa aaaaaaagta ctagtgcgacg cgtggccaga aactgaaatg 1120
30 aaatgatttt tatgtttttc cttttgaatt tatagggttt atgttttntt gaatgcaatg 1180

tgaaggtggt ggctaacatc ctgacaatga attccatccc ttgtgtatat gtgtgtcttt 1240

35 aaaagtaaaa tyttcartca tatggtaaaa catgttttaa atttaaaata tttaaaattg 1300

ttttcaacct ttttgtgtag cgcttgtcaa atatcttaac attgtcttgt tttgttttca 1360

ttgtgtgcaa ctttcctgaa ttagaaaatt aaatttttgc atttatgtta ggtgttctgt 1420
40 aatagatatg acttatatgt gaaaaacttt cataaagaag tcattttcac taatrcagtg 1480

actctcactg gtaactgtat tgtgaaatgc acaaaaactgt tttagtgtg aatgctataa 1540

45 ggaatttagg ttgtatgaat tctacaatcc tataataaat tttaccatat tcaaaaaa 1598

<210> 5
<211> 263
50 <212> PRT
    <213> Schwein

<400> 5
Met Val Lys Ile Ala Phe Asn Thr Pro Ala Ala Val Gln Lys Glu Glu
55 1          5          10          15
Ala Gln Gln Asp Val Glu Ala Leu Val Ser His Thr Val Arg Ala Gln
      20          25          30
Ile Leu Thr Gly Lys Glu Leu Gln Val Ala Thr Lys Glu Lys Glu Gly
      35          40          45

```


Phe Ser Gly Arg Cys Met Leu Thr Leu Val Gly Leu Ser Phe Ile Leu
50 55 60
Ala Gly Leu Ile Val Gly Gly Ala Cys Ile Tyr Lys Tyr Phe Met Pro
65 70 75 80
5 Lys Ser Thr Ile Tyr His Gly Glu Met Cys Phe Phe Asp Ser Ala Asp
85 90 95
Pro Ala Asn Phe Leu Gln Gly Gly Glu Pro Tyr Phe Leu Pro Val Met
100 105 110
10 Glu Glu Ala Asp Ile Arg Glu Asp Asp Asn Ile Ala Ile Ile Asp Val
115 120 125
Pro Val Pro Ser Phe Ser Asp Ser Asp Pro Ala Ala Ile Ile His Asp
130 135 140
Phe Glu Lys Gly Met Thr Ala Tyr Leu Asp Leu Leu Leu Gly Asn Cys
145 150 155 160
15 Tyr Leu Met Pro Leu Asn Thr Ser Ile Val Met Pro Pro Lys Tyr Leu
165 170 175
Val Glu Leu Phe Gly Lys Leu Ala Arg Gly Lys Tyr Leu Pro His Ala
180 185 190
20 Tyr Val Val His Glu Asp Leu Val Ala Val Glu Glu Ile His Asp Val
195 200 205
Ser Asn Leu Gly Ile Phe Ile Tyr Gln Leu Cys Asn Asn Arg Lys Ser
210 215 220
Phe Arg Leu Arg Arg Arg Asp Leu Leu Leu Gly Phe Asn Lys Arg Ala
225 230 235 240
25 Ile Asp Lys Cys Trp Lys Ile Arg His Phe Pro Asn Glu Phe Ile Val
245 250 255
Glu Thr Lys Ile Cys Gln Glu
260

30

<210> 6

<211> 814

<212> DNA

35 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S231
aus BMEC aus Schweinehirn

40

<400> 6

acatttcttt aggttcattc tgggtaaggg gatgttcgag ggtgggccac caaattgtct 60
gggctgggga taaagcagtt ggcaagcaaa aactatggga tgatgaactt ttcaatwatg 120
atttaattgat cacatgagta tagaaagctg ttttgagtgc tgaaacagac ttacctatca 180
45 gatatatcca aaagagattc tatgttaaaa agtcagacta tgactggagt gaacctatgta 240
ttcccttgtc ttttactttg tttctgtgac atttatgttt catgtaactt gcattatgggt 300
tgggtggggt gtccatgtac tgtatttttg cttcttcttt aataggattg atatttcata 360
tabtataatt gtgaatatatt tgakacraat gtttataact ctaggcatat aaaaacagat 420
tctgattccc ttcactgtgt gaatgttttc tgttgaaaaa atggaggata aatatggata 480
50 ctaatgacac tcattcctaa ttaagttttc aatcagtttg atttggataa cttgcattta 540
tccgagatat tgagctactt tctgataatg catcaagcat ttctaccata actctttcac 600
gcaactgaat gttgttaagt atagttttat cttgctttaa ttaaacttct taagcaaaaa 660
aaaagaaact tcataagcta atacattaga gaaaggttat gatcttgaat cnagaatggc 720
ttatggcatt aaggaatgag atacttgtaa atttctttg aaacagccaa ctcctctgtt 780
55 gtgtcttcac aattcaaaag atatgcctca ctgt 814

<210> 7

<211> 22

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

5 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7
ccataactct ttcacgcaac tg

22

10

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

15

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

20 <400> 8
acaacagagg agttggctgt tt

22

<210> 9
<211> 22
25 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

30

<400> 9
ggtattgctg gctggtatct tt

22

35 <210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 10
atgtaggaat agccgtggtg at

22

45

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
50 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

55 <400> 11
ggtctttgtg ttccagctct tc

22

<210> 12

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 12
 ttctcaggac cagatagaga acg

23

10

<210> 13
 <211> 483
 <212> DNA
 15 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S231
 aus BMEC aus Schweinehirn

20

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(480)

25

<400> 13
 atg ttg gtg tta ctg gct ggt atc ttt gtg gtc cac atc gcc act gtc 48
 Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Ile Phe Val Val His Ile Ala Thr Val
 1 5 10 15

30

gtc atg ctg ttc gtt tgc acc att gcc aat gtc tgg gtg gtc tca gat 96
 Val Met Leu Phe Val Cys Thr Ile Ala Asn Val Trp Val Val Ser Asp
 20 25 30

35

gcg gga caa gga tct gtc ggt ctt tgg aaa aac tgt acc agt gct ggc 144
 Ala Gly Gln Gly Ser Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40 45

40

tgt act gat acc ctg tta tac ggc ggt gaa gat gcc ctc aag tcg gtg 192
 Cys Thr Asp Thr Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Asp Ala Leu Lys Ser Val
 50 55 60

45

cag gcc ttc atg atc ctg tct atc atc ttc tct gtc gtc tcc ctc gtg 240
 Gln Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile Ile Phe Ser Val Val Ser Leu Val
 65 70 75 80

gtc ttt gtg ttc cag ctc ttc acc atg gag aaa ggc aac cgc ttc ttc 288
 Val Phe Val Phe Gln Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe
 85 90 95

50

ctc tcg gga gcc acc atg ctg gtg tgc tgg ctg tgc atc atg gtg ggg 336
 Leu Ser Gly Ala Thr Met Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Met Val Gly
 100 105 110

55

gcc tcc gtc tat act cat cat tat gcc aac agt tct aaa aac caa tac 384
 Ala Ser Val Tyr Thr His His Tyr Ala Asn Ser Ser Lys Asn Gln Tyr
 115 120 125

tcg gcg agt cac cat ggc tat tcc ttc atc ctc gcc tgg atc tgc ttc 432
 Ser Ala Ser His His Gly Tyr Ser Phe Ile Leu Ala Trp Ile Cys Phe
 130 135 140

5 tgc ttc agc ttc atc atc ggc gtt ctc tat ctg gtc ctg aga aag aaa 480
 Cys Phe Ser Phe Ile Ile Gly Val Leu Tyr Leu Val Leu Arg Lys Lys
 145 150 155 160

taa 483

10

<210> 14
 <211> 160
 <212> PRT

15 <213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S231
 aus BMEC aus Schweinehirn

<400> 14

20 Met Leu Val Leu Leu Ala Gly Ile Phe Val Val His Ile Ala Thr Val
 1 5 10 15

Val Met Leu Phe Val Cys Thr Ile Ala Asn Val Trp Val Val Ser Asp
 20 25 30

25

Ala Gly Gln Gly Ser Val Gly Leu Trp Lys Asn Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40 45

30

Cys Thr Asp Thr Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Asp Ala Leu Lys Ser Val
 50 55 60

Gln Ala Phe Met Ile Leu Ser Ile Ile Phe Ser Val Val Ser Leu Val
 65 70 75 80

35

Val Phe Val Phe Gln Leu Phe Thr Met Glu Lys Gly Asn Arg Phe Phe
 85 90 95

Leu Ser Gly Ala Thr Met Leu Val Cys Trp Leu Cys Ile Met Val Gly
 100 105 110

40

Ala Ser Val Tyr Thr His His Tyr Ala Asn Ser Ser Lys Asn Gln Tyr
 115 120 125

45

Ser Ala Ser His His Gly Tyr Ser Phe Ile Leu Ala Trp Ile Cys Phe
 130 135 140

Cys Phe Ser Phe Ile Ile Gly Val Leu Tyr Leu Val Leu Arg Lys Lys
 145 150 155 160

50

<210> 15
 <211> 513
 <212> DNA

55 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S012
 aus BMEC aus Schweinehirn

<400> 15

acatagaatt caatcaagtg taattcagaa taatgtgtat attagcatat ttacagtaat 60
 gggatgtcat cgctattgtt agaatactga catcactttt ctgagcagaa attgaaactg 120
 5 taaattttaac cttttaatta tcacctcacc tgaaaagggtt ggttgagata ctacgcagc 180
 atgtattata ttaaccatgt catgtttaag ttattaaatt cagattattt ataacttatt 240
 atcttagggc ctgcctcatg tcttctaggg tatttgagta atcatcctat atttaaagtt 300
 aaaactttga cttaaaaaac actgttaatg aaagttccct agcgcttttc ttattttcaa 360
 attggtctta tgggtagtag tagagaattc catgctgttc tgaggctagc ttccaggtaa 420
 10 acagtgattt ttttttctt ttttctttc tttcttggtg agtgggtccag agttttaage 480
 tacttttctc aaagtttcaa ccctttccca ggt 513

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 16

gtatcgggag tggaggatta ca 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 17

cccagagtat atttgtttct gg 22

<210> 18

<211> 1674

<212> DNA

<213> Schwein

<220>

<221> CDS

<222> (40)..(774)

<400> 18

ccgtctgcct ggtcccarag gcgcaccggc ttcggtaac atg ttt gtg gca gct 54
 Met Phe Val Ala Ala
 1 5

cgg aca ggc cag aga acc ttg aga aag gtg gtc tgc gga tgc cgt cca 102
 Arg Thr Gly Gln Arg Thr Leu Arg Lys Val Val Ser Gly Cys Arg Pro
 10 15 20

aaa tcg gcg aca gcg act gga gtc ccg gct cct gcg cag ggg cct ccg 150
 Lys Ser Ala Thr Ala Thr Gly Val Pro Ala Pro Ala Gln Gly Pro Pro
 25 30 35

cgg aac atc aga tac tta gcc tcc tgt ggt ata ctg atg aac aga act 198
 Arg Asn Ile Arg Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Ile Leu Met Asn Arg Thr
 40 45 50

5 ctt cca ctg cat tcc tca ttt ttg cct aag gag atg tat gca aga acc 246
 Leu Pro Leu His Ser Ser Phe Leu Pro Lys Glu Met Tyr Ala Arg Thr
 55 60 65

10 ttc ttc aga att gct gca cca tta ata aac aaa aga aaa gaa tat tca 294
 Phe Phe Arg Ile Ala Ala Pro Leu Ile Asn Lys Arg Lys Glu Tyr Ser
 70 75 80 85

15 gag agg agg att ata gga tat tct atg cag gaa atg tat gac gta gta 342
 Glu Arg Arg Ile Ile Gly Tyr Ser Met Gln Glu Met Tyr Asp Val Val
 90 95 100

tcg gga atg gaa gat tac aag cat ttt gtg cct tgg tgc aaa aaa tca 390
 Ser Gly Met Glu Asp Tyr Lys His Phe Val Pro Trp Cys Lys Lys Ser
 105 110 115

20 gat gta ata tca agg aga tct gga tac tgc aaa aca cga tta gaa att 438
 Asp Val Ile Ser Arg Arg Ser Gly Tyr Cys Lys Thr Arg Leu Glu Ile
 120 125 130

25 ggg ttt cca ccc gta ttg gag cgc tat acg tca gta gta acc ttg gtg 486
 Gly Phe Pro Pro Val Leu Glu Arg Tyr Thr Ser Val Val Thr Leu Val
 135 140 145

30 aaa cca cat ttg gta aag gca tcc tgt gca gat ggg aag ctc ttt aat 534
 Lys Pro His Leu Val Lys Ala Ser Cys Ala Asp Gly Lys Leu Phe Asn
 150 155 160 165

35 cac tta gag act gtt tgg cgt ttt agc cca ggt ctt cct ggc tac cca 582
 His Leu Glu Thr Val Trp Arg Phe Ser Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro
 170 175 180

aga act tgt act ttg gat ttt tca att tct ttt gaa ttt cga tca ctt 630
 Arg Thr Cys Thr Leu Asp Phe Ser Ile Ser Phe Glu Phe Arg Ser Leu
 185 190 195

40 ctg cac tct cag ctt gcc aca ttg ttt ttt gat gaa gtt gtg aag cag 678
 Leu His Ser Gln Leu Ala Thr Leu Phe Phe Asp Glu Val Val Lys Gln
 200 205 210

45 atg gta gct gct ttt gaa aga aga gca tgt aaa ctg tat ggt cca gaa 726
 Met Val Ala Ala Phe Glu Arg Arg Ala Cys Lys Leu Tyr Gly Pro Glu
 215 220 225

50 aca agt ata cct cgg gaa tta atg ctt cat gaa gtt cat cac aca taa 774
 Thr Ser Ile Pro Arg Glu Leu Met Leu His Glu Val His His Thr
 230 235 240 245

gagaaaagga aatgggtgcc tacttgtaac tagttttattc acttttagga agtgctttca 834

55 tcatttttgct ytcagaaggc agaaagcatt tgtcaaacac agctttgata taaacctgta 894

ctttgcaactt ggaatatgga accacatgta catagaattc aatcaagtgt aattcagaat 954

aatgtgtata ttagcatatt tacagtaatg ggatgtcatc gctattgtta gaatactgac 1014

atcacttttc tgagcagaaa ttgaaactgt aaatttaacc ttttaattat cacctcacct 1074
 gaaaagggttg gttgagatac tcacgcagca tgtattatat taaccatgtc atgtttaagt 1134
 5 tattaaattc agattattta taacttatta tcttagggcc tgcctcatgt cttctagggt 1194
 atttgagtaa tcatcctata tttaaagtta aaactttgac ttaaaaaaca ctgttaatga 1254
 10 aagttcccta gcgcttttct tattttcaaa ttggtcttat gggtagtagt agagaattcc 1314
 atgctgttct gaggctagct tccaggtaaa cagtgatttt ttttttcttt ttttctttct 1374
 ttcttggtga gtggtccaga gttttaagct actttttctca aagtttcaac cctttcccag 1434
 15 gtactttgac tactatttca gtaatgttga ttgtgtgtca agttttgtct acagcagtg 1494
 gcaatagatg aaggaagtcg gttgatatgt ctccaacacc atgcattctg attttctatt 1554
 20 tattgtgtat actcactttc aataatgtat ttccaactga tatttttgta aacaaatcag 1614
 tgtaaggact gaagtggtaa cttaataaag ttaatttggt taaaaataa aaaaaaaaaa 1674

25 <210> 19
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Schwein

30 <400> 19
 Met Phe Val Ala Ala Arg Thr Gly Gln Arg Thr Leu Arg Lys Val Val
 1 5 10 15
 Ser Gly Cys Arg Pro Lys Ser Ala Thr Ala Thr Gly Val Pro Ala Pro
 20 25 30
 35 Ala Gln Gly Pro Pro Arg Asn Ile Arg Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Ile
 35 40 45
 Leu Met Asn Arg Thr Leu Pro Leu His Ser Ser Phe Leu Pro Lys Glu
 50 55 60
 Met Tyr Ala Arg Thr Phe Phe Arg Ile Ala Ala Pro Leu Ile Asn Lys
 40 65 70 75 80
 Arg Lys Glu Tyr Ser Glu Arg Arg Ile Ile Gly Tyr Ser Met Gln Glu
 85 90 95
 Met Tyr Asp Val Val Ser Gly Met Glu Asp Tyr Lys His Phe Val Pro
 100 105 110
 45 Trp Cys Lys Lys Ser Asp Val Ile Ser Arg Arg Ser Gly Tyr Cys Lys
 115 120 125
 Thr Arg Leu Glu Ile Gly Phe Pro Pro Val Leu Glu Arg Tyr Thr Ser
 130 135 140
 Val Val Thr Leu Val Lys Pro His Leu Val Lys Ala Ser Cys Ala Asp
 50 145 150 155 160
 Gly Lys Leu Phe Asn His Leu Glu Thr Val Trp Arg Phe Ser Pro Gly
 165 170 175
 Leu Pro Gly Tyr Pro Arg Thr Cys Thr Leu Asp Phe Ser Ile Ser Phe
 180 185 190
 55 Glu Phe Arg Ser Leu Leu His Ser Gln Leu Ala Thr Leu Phe Phe Asp
 195 200 205
 Glu Val Val Lys Gln Met Val Ala Ala Phe Glu Arg Arg Ala Cys Lys
 210 215 220

Leu Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Ile Pro Arg Glu Leu Met Leu His Glu
 225 230 235 240
 Val His His Thr

5

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

15 <400> 20

cgcggtggtga atgatctgta

20

<210> 21

20 <211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

25 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 21

ctccatgatc aggtcctcca g

21

30

<210> 22

<211> 607

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: partielle
CDNA-Sequenz von NSE2 aus Schwein

40 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(192)

<400> 22

45 gag gac ctg atc atg gag aaa cgg cgc aac gac cag ata ggg cgc gcc 48
 Glu Asp Leu Ile Met Glu Lys Arg Arg Asn Asp Gln Ile Gly Arg Ala
 1 5 10 15

gcg gtg cta cag gag ctg gcc acg cac ctg cac ccc gcg gag ccg gac 96
 50 Ala Val Leu Gln Glu Leu Ala Thr His Leu His Pro Ala Glu Pro Asp
 20 25 30

gag ggc gac agc gac gcc gcg cgg act acg ccg cct ccc ggg cgc tcc 144
 55 Glu Gly Asp Ser Asp Ala Ala Arg Thr Thr Pro Pro Pro Gly Arg Ser
 35 40 45

cag gcg ccg ggc caa gag gag gag gac cga gag gcg gtg gtg cac tga 192
 Gln Ala Pro Gly Gln Glu Glu Glu Asp Arg Glu Ala Val Val His
 50 55 60

caggcgagct gagtgcggag ctgcgtgagg gagcctttgc agcagccgct gccccctccc 252
 ttctctccct ccctcctcca ccatcttctg ggtcccaact gggctcctgg gccatttgga 312
 5 aaacggagag ttggcgaaaa gcgctgccag ctgtggcttg agtttggtat cttggacgga 372
 ggaggaagag ggagcagctt ccatggaccc ctgatcacta cttgaggaga attttctgt 432
 10 ggattcaact gactagctat tgtgatgtaa gcagtttgag gtgactggcc cagcaggagt 492
 gagaagaatt tatcttcagc ataaacttca ttattctaca gtgtttcttc atttgcctga 552
 gaggtaagga tgctatgtag acagaaacaa aggaagaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 607
 15

<210> 23

<211> 63

<212> PRT

20 <213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: partielle
 CDNA-Sequenz von NSE2 aus Schwein

<400> 23

25 Glu Asp Leu Ile Met Glu Lys Arg Arg Asn Asp Gln Ile Gly Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala Val Leu Gln Glu Leu Ala Thr His Leu His Pro Ala Glu Pro Asp
 20 25 30
 Glu Gly Asp Ser Asp Ala Ala Arg Thr Thr Pro Pro Pro Gly Arg Ser
 30 35 40 45
 Gln Ala Pro Gly Gln Glu Glu Glu Asp Arg Glu Ala Val Val His
 50 55 60

35

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

40

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 24

45 cgagaccctg tgggtggctta ttac

24

<210> 25

<211> 24

50 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

55

<400> 25

ctggtgtatt agctggagcg tgtg

24

<210> 26
 <211> 586
 <212> DNA
 <213> Schwein

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(585)

10

<400> 26

cga gac cct gtg gtg gct tat tac tgt cgt tta tat gca atg caa act 48
 Arg Asp Pro Val Val Ala Tyr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ala Met Gln Thr
 1 5 10 15

15

gga atg aag att gat agt aaa act cct gaa tgt cgt aaa ttt tta tca 96
 Gly Met Lys Ile Asp Ser Lys Thr Pro Glu Cys Arg Lys Phe Leu Ser
 20 25 30

20

aag ctg atg gat cag tta gaa gct ctt aag aaa cag ttg ggt gac aat 144
 Lys Leu Met Asp Gln Leu Glu Ala Leu Lys Lys Gln Leu Gly Asp Asn
 35 40 45

25

gaa gct gtt act caa gaa ata gtt ggt tct gcc cac ttg gag aat tat 192
 Glu Ala Val Thr Gln Glu Ile Val Gly Ser Ala His Leu Glu Asn Tyr
 50 55 60

30

gct ttg aaa atg ttt tta tat gca gat aat gaa gat cgg gct ggg cga 240
 Ala Leu Lys Met Phe Leu Tyr Ala Asp Asn Glu Asp Arg Ala Gly Arg
 65 70 75 80

ttt cat aaa aac atg atc aag tcc ttc tat act gca agt ctt tta ata 288
 Phe His Lys Asn Met Ile Lys Ser Phe Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Ile
 85 90 95

35

gat gtc ata aca gtg ttt gga gaa ctc act gat gaa aat gtg aaa cac 336
 Asp Val Ile Thr Val Phe Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asn Val Lys His
 100 105 110

40

aga aag tat gca agg tgg aag gca aca tat att cat aat tgt tta aag 384
 Arg Lys Tyr Ala Arg Trp Lys Ala Thr Tyr Ile His Asn Cys Leu Lys
 115 120 125

45

aat gga ggg act cct caa gca ggt cct gtg ggc att gaa gaa gat aat 432
 Asn Gly Gly Thr Pro Gln Ala Gly Pro Val Gly Ile Glu Glu Asp Asn
 130 135 140

50

gac ata gaa gaa aat gaa gat gct gga gca acc tct ctg ccc act cag 480
 Asp Ile Glu Glu Asn Glu Asp Ala Gly Ala Thr Ser Leu Pro Thr Gln
 145 150 155 160

cca cct cag cca tca tct tcc act tat gac cca ggc aac atg cca tcg 528
 Pro Pro Gln Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Asp Pro Gly Asn Met Pro Ser
 165 170 175

55

agc agc tat act gga ata cag att cct ccc ggt gca cac gct cca gct 576
 Ser Ser Tyr Thr Gly Ile Gln Ile Pro Pro Gly Ala His Ala Pro Ala
 180 185 190

aat aca cca g
Asn Thr Pro
195

586

5
<210> 27
<211> 195
<212> PRT
<213> Schwein

10
<400> 27
Arg Asp Pro Val Val Ala Tyr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ala Met Gln Thr
1 5 10 15

15 Gly Met Lys Ile Asp Ser Lys Thr Pro Glu Cys Arg Lys Phe Leu Ser
20 25 30

Lys Leu Met Asp Gln Leu Glu Ala Leu Lys Lys Gln Leu Gly Asp Asn
35 40 45

20 Glu Ala Val Thr Gln Glu Ile Val Gly Ser Ala His Leu Glu Asn Tyr
50 55 60

Ala Leu Lys Met Phe Leu Tyr Ala Asp Asn Glu Asp Arg Ala Gly Arg
25 65 70 75 80

Phe His Lys Asn Met Ile Lys Ser Phe Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Ile
85 90 95

30 Asp Val Ile Thr Val Phe Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asn Val Lys His
100 105 110

Arg Lys Tyr Ala Arg Trp Lys Ala Thr Tyr Ile His Asn Cys Leu Lys
115 120 125

35 Asn Gly Gly Thr Pro Gln Ala Gly Pro Val Gly Ile Glu Glu Asp Asn
130 135 140

Asp Ile Glu Glu Asn Glu Asp Ala Gly Ala Thr Ser Leu Pro Thr Gln
40 145 150 155 160

Pro Pro Gln Pro Ser Ser Ser Thr Tyr Asp Pro Gly Asn Met Pro Ser
165 170 175

45 Ser Ser Tyr Thr Gly Ile Gln Ile Pro Pro Gly Ala His Ala Pro Ala
180 185 190

Asn Thr Pro
195

50

<210> 28
<211> 20
55 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 28
aaaaggcccc cagggttacg

20

5

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 29
ggagtgggca gcaggtgagc

20

15

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

20

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 30
ttaacctgca cagcgacaag t

21

25

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

30

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 31
ttgctgaaga tctcagcgtt c

21

40

<210> 32
<211> 1194
<212> DNA
<213> Schwein

45

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(741)

50

<400> 32
acg gac gag gag ctc cgc agg cgc cag ctg act tgc acc gag gag atg 48
Thr Asp Glu Glu Leu Arg Arg Arg Gln Leu Thr Cys Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

55

gcc cag cga ggg ctg ccg cct gcc ctt gac ccc tgg gag ccg aag gcg 96
Ala Gln Arg Gly Leu Pro Pro Ala Leu Asp Pro Trp Glu Pro Lys Ala
20 25 30

gac tgg gcg ccc gca ggc agc ctc agc ggt gag gcc ggc cag aag gat 144
 Asp Trp Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Gly Glu Ala Gly Gln Lys Asp
 35 40 45

5 gtc aac ggg ccc ctg agg gag ctg cgc cca agg ctc tgc cac ctg cga 192
 Val Asn Gly Pro Leu Arg Glu Leu Arg Pro Arg Leu Cys His Leu Arg
 50 55 60

10 aaa ggc ccc cag ggt tac ggg ttt aac ctg cac agc gac aag tcc cgg 240
 Lys Gly Pro Gln Gly Tyr Gly Phe Asn Leu His Ser Asp Lys Ser Arg
 65 70 75 80

15 cct gga cag tac atc cgc tcc gtg gac cca ggc tca cct gct gcc cac 288
 Pro Gly Gln Tyr Ile Arg Ser Val Asp Pro Gly Ser Pro Ala Ala His
 85 90 95

tcc ggc ctc cga gcc cag gac cga ctc ata gag gtg aac ggg cag aat 336
 Ser Gly Leu Arg Ala Gln Asp Arg Leu Ile Glu Val Asn Gly Gln Asn
 100 105 110

20 gtg gag ggg ctg cgg cac gcg gag gtg gtt gcc tgc atc aag gcg cgg 384
 Val Glu Gly Leu Arg His Ala Glu Val Val Ala Cys Ile Lys Ala Arg
 115 120 125

25 gag gac gag gcc cgg ctg ctg gtg gtg gac ccc gag acg gat gtg tac 432
 Glu Asp Glu Ala Arg Leu Leu Val Val Asp Pro Glu Thr Asp Val Tyr
 130 135 140

30 ttc aag cgg ctg cgg gtc aca ccc acc cag gag cac atg gaa ggt cca 480
 Phe Lys Arg Leu Arg Val Thr Pro Thr Gln Glu His Met Glu Gly Pro
 145 150 155 160

35 ctg tca tca cct gtc acc aat ggg acc agc tca gcc cag ctc aat ggt 528
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Asn Gly Thr Ser Ser Ala Gln Leu Asn Gly
 165 170 175

ggc tcc gtg tgc tcg tcc cga agt gac ctg ccc ggc tta gac aag gac 576
 Gly Ser Val Cys Ser Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gly Leu Asp Lys Asp
 180 185 190

40 act gag gac agc agc acc tgg aag cgt gac cct ttc cag gag agt ggc 624
 Thr Glu Asp Ser Ser Thr Trp Lys Arg Asp Pro Phe Gln Glu Ser Gly
 195 200 205

45 ctc cac ctg agc ccc acg gcg gct ggg gcc aag gag aag gcg agg gcc 672
 Leu His Leu Ser Pro Thr Ala Ala Gly Ala Lys Glu Lys Ala Arg Ala
 210 215 220

50 acc agg gtc aac aag cgg gcg cca cag atg gac tgg aac cgg aag cgt 720
 Thr Arg Val Asn Lys Arg Ala Pro Gln Met Asp Trp Asn Arg Lys Arg
 225 230 235 240

55 gag atc ttc agc aac ttc tga gacccccac cctccgccgc agccgccgcc 771
 Glu Ile Phe Ser Asn Phe
 245

tgggtccccag ccgggacctcc tctgggcatg gaccttgggc cttgcccaga gcgccccgag 831
 cctcagtgga ctgcagcggg ggcaccttcg ctcgctaagc cgtggtggtc ccaccacccc 891

ccatgaacca gcccggtgccc cagtgaagccc cegtcctgcc cccctccac ggggtgctgg 951
ggagcgggca gaggaagccc ctgagacggg agggacagag acaccagag aggtgggctg 1011
5 gggaggggag gttgggggtga cccgccagge cgggcccttg ctgctctgcc tgggcctgct 1071
gacttaaagg aatttggtt ttggcttttt ttccaacacg agctctggct ccacacatgt 1131
10 ttccacttaa taccagagcc cccaccccca tcccctcagg acgtgctctc taaataattg 1191
caa 1194

15 <210> 33
<211> 246
<212> PRT
<213> Schwein

20 <400> 33
Thr Asp Glu Glu Leu Arg Arg Arg Gln Leu Thr Cys Thr Glu Glu Met
1 5 10 15
Ala Gln Arg Gly Leu Pro Pro Ala Leu Asp Pro Trp Glu Pro Lys Ala
20 25 30
25 Asp Trp Ala Pro Ala Gly Ser Leu Ser Gly Glu Ala Gly Gln Lys Asp
35 40 45
Val Asn Gly Pro Leu Arg Glu Leu Arg Pro Arg Leu Cys His Leu Arg
50 55 60
Lys Gly Pro Gln Gly Tyr Gly Phe Asn Leu His Ser Asp Lys Ser Arg
65 70 75 80
30 Pro Gly Gln Tyr Ile Arg Ser Val Asp Pro Gly Ser Pro Ala Ala His
85 90 95
Ser Gly Leu Arg Ala Gln Asp Arg Leu Ile Glu Val Asn Gly Gln Asn
100 105 110
35 Val Glu Gly Leu Arg His Ala Glu Val Val Ala Cys Ile Lys Ala Arg
115 120 125
Glu Asp Glu Ala Arg Leu Leu Val Val Asp Pro Glu Thr Asp Val Tyr
130 135 140
Phe Lys Arg Leu Arg Val Thr Pro Thr Gln Glu His Met Glu Gly Pro
145 150 155 160
40 Leu Ser Ser Pro Val Thr Asn Gly Thr Ser Ser Ala Gln Leu Asn Gly
165 170 175
Gly Ser Val Cys Ser Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gly Leu Asp Lys Asp
180 185 190
45 Thr Glu Asp Ser Ser Thr Trp Lys Arg Asp Pro Phe Gln Glu Ser Gly
195 200 205
Leu His Leu Ser Pro Thr Ala Ala Gly Ala Lys Glu Lys Ala Arg Ala
210 215 220
Thr Arg Val Asn Lys Arg Ala Pro Gln Met Asp Trp Asn Arg Lys Arg
50 225 230 235 240
Glu Ile Phe Ser Asn Phe
245

55 <210> 34
<211> 63
<212> PRT
<213> Schwein

<400> 34

Glu Asp Leu Ile Met Glu Lys Arg Arg Asn Asp Gln Ile Gly Arg Ala
 1 5 10 15

Ala Val Leu Gln Glu Leu Ala Thr His Leu His Pro Ala Glu Pro Asp
 20 25 30

Glu Gly Asp Ser Asp Ala Ala Arg Thr Thr Pro Pro Pro Gly Arg Ser
 35 40 45

Gln Ala Pro Gly Gln Glu Glu Glu Asp Arg Glu Ala Val Val His
 50 55 60

<210> 35

<211> 367

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S064
 aus BMEC aus Schweinehirn

<400> 35

acaataccag ggggtcccca gagagatcct gttcataatt ttgtcctttt taacaccatt 60
 tcatttgatc aagctgatta gctaagatct tggtacagca ttgacagaaa gcctgaagct 120
 tgatggataa caacagtttt aaaccttaag aaatgacaag tataaatata gacacttcaa 180
 tgtagtttta cattctgagg caagaaatat attatacagg gcctgctgtt tcctctttta 240
 30 tgctctaaaa gcaccaattt atgttaaaga tggcaatgtg taattataat cattataatc 300
 tgattagacc aaacacagga gcaaagctgt aattgctttt agtttttgtt tttttaacat 360
 gctctgt 367

<210> 36

<211> 3071

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon S064.3
 aus BMEC aus Schweinehirn

<400> 36

45 sctwtggcgg ggwatctcwa ggacaaatww waatggaatw atctctggct ggcactcatt 60
 taattcttaa ctatgtaaaa caacatgagt agaaaaaat ttagtggtat tatgcctaga 120
 atagataggt gaattccatt gatgtttatc tttgaagacc agctttatgc gtgaactttt 180
 catctgwggc tttggatcca aaacatttca tgtccagttc agttctaaag gttcttttat 240
 attttgtcag ggtagtctct ttgagataca gcatgatgac ttgaatctag cagaatattg 300
 50 tgcctggctac ctaaaagaag gggttcaaat cttaatttgg ccattacctt ttgaccttag 360
 acagttacta ctgtttatga tcttccttct gtttttccca tgcagaggaa cttaaacaaa 420
 ttatagagtg ccaacatgtc tcttggtttt aaaatcgtga atctattaaa atcccgaatc 480
 tactaaaaa ctattaaaaa ctggaaaaaa aattcaacta gggaaagaca tgtaatatga 540
 aatttatttt tacctatcat ttgattccca ctttattatc ytttcattta gtatatgaat 600
 55 acaatccaat aagaaaatga aggtcaacta ctgccactcc acttaaattg aactaatagt 660
 taatgaagtg caaaagagaa aataagccat attgctaaga agatgatata ttaagctgct 720
 gataaaatc cagtgtgtgt tgaaaatact cttttagaag ataccttgct tattttcctg 780
 gcttttatta attggatgga aatggttagt ttgatcagag tttattggct ctagaggctg 840
 ccccaaattg tagctctgtt tgactttcca gtattgaaag aatactggaa atgtcaatat 900

```

    ttacaaatg tctgtacaaa tctgaaagta gtttatatcc atgggttagtt ttttcagtaa 960
    cgttccatcc ttattcattt agcattactg taaagccagg ttcccaagaa gtatttttcta 1020
    agagttccaa gtaaccacag ctacatagag aaagccaata aaaacaaaac ttttttagcta 1080
    cttctctgta aattttaagt agaaaaaac cagacctaaa gtcagctttr aatgtatgtg 1140
5   gtctagttaa atgtttggga aatgtttatt tggagggtta gaggcatacc gaagcaggag 1200
    tcaaaacaaa gttggtggta aagattaaca tgaagtaaaa aaatcttcag tagaaaaatag 1260
    aaagtttgaa tgaaaacaat gagttgtccc cattcaaggc acttaaaatw actagaaaaat 1320
    tctgtctttt actgtaattg gatggcctat attatttcta atgtggccaa aggactaaag 1380
    accaatcagg tttctagaat tggggagcgt agtcacatag aggcattctt tgcatttttt 1440
10  aannnaccag taatcttctt tttcccttta gaaakggaga aataaaatgt tctgtacata 1500
    tcttttgtaa tagaaagcaa aattctagaa gaatggaagt atcctcttac accaacttgt 1560
    agttttaatt gaaaaattac ctcatTTTTt agtccatacg gtgctttgct cgagtttgtg 1620
    gaatggtcca ccatcccat aaaacccgct tcaccaagc tgtatttcaa atatgcaaaa 1680
    ttcacagcta agggatagca gtccttggag gttttgtttt ccttcaactg cgcttaccac 1740
15  cagcagagct aataacgtga tgtaccagg tgcatactg cttcattaaa gcacatgggc 1800
    aagtgtttag tcaatatTTa attagtttaa ttaaaatcaa ataagggaata ggaaaaaccc 1860
    ttaagtttga ttgagttaca ttatactgtg aatatatttc catctgtgtt gataagacat 1920
    caaatgacta tcagttgata ttgattatac ataatttatt tgcataattct ggccctattc 1980
    atgagagggt ataattcatt taatcttaca ttttccctca ggaaattcag ggactctaca 2040
20  gccctatttt tgttctcttg gagtaaawtg ttcagtgtag tttatgaaaa cttttcattt 2100
    tggtttttaa aaaggcttag ctgctagttc attaaaagtg tgaaataaaa tgatggttat 2160
    gatTTTTcca attaatgtta taaattttas cstrtycrtc yrwkgtacag agcatgttaa 2220
    aaaaacaaaa actaaaagca attacagctt tgctcctgtg tttggtctaa tcagattata 2280
    atgattataa ttacacattg ccatcttaac ataaattggt gcttttagag cattaaagag 2340
25  gaaacagcag gccctgtata atatatttct tgctcagaa tgtaaaacta cattgaagtg 2400
    tctgtattta tacttgtcat ttcttaaggt ttaaaactgt tgttatccat caagcttcag 2460
    gctttctgca aatgctgtaa caagatctta gctaactcagc ttgrtcaaata gaaatgggtg 2520
    taaaaggac aaaattatga acaggatctc tctgggggac ccctgggtatt gtacmkrms 2580
    gggsggaacy gtctykmag ccacaaactg tgcgtcataa tcccacccaa acaactgaca 2640
30  tgtgtgtwat tggttcaata cataagcatt aataaaatta aaggaacaaa ttacttaaag 2700
    cagtcacatc atcatttctt caaagtgggt yaaagcatgt tcttctaaat ggtggagttg 2760
    tttaaagaca tgttttaaatt tttgatagct ttactactgt cataaaatgc ttctatatgt 2820
    taagtttagg ttgctggtac tcatgatttt ttacttctgc aattatgctg taatgagttg 2880
    cttgcatgcc tacttaccce agtgaaagga tgctgtttgc tctggaatgt tcatctttta 2940
35  gacaggtttk sgctcatttg caatcatggt gcaatacagt gtaacattca tttgttttca 3000
    gtcaatagtt ttatttttgt cmcaataaat aattactttt ccaaaaaaaa aaaaaaaa 3060
    aaaaaaaaa a 3071

```

```

40  <210> 37
    <211> 24
    <212> DNA
    <213> Künstliche Sequenz

```

```

45  <220>
    <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

```

```

    <400> 37
    taatgcaggg aaaaccacca ttct

```

24

```

50
    <210> 38
    <211> 22
    <212> DNA
55  <213> Künstliche Sequenz

```

```

    <220>
    <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

```


<400> 38
aaccaagaga catgttggca ct

22

5 <210> 39
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 39
atagcattga cagggaaacga ct

22

15 <210> 40
<211> 23
<212> DNA
20 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

25 <400> 40
ctgctagatt caagtcatca tgc

23

<210> 41
30 <211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 41
ctcgtgatgg ggctgatctt c

21

40 <210> 42
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

45 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 42
50 atctcacacc aatccgggag gt

22

<210> 43
<211> 540
55 <212> DNA
<213> Schwein

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(537)

<400> 43

```

5  atg ggg ctg atc ttc gct aaa ctg tgg agc ctc ttc tgt aac caa gag 48
   Met Gly Leu Ile Phe Ala Lys Leu Trp Ser Leu Phe Cys Asn Gln Glu
     1             5             10             15

10  cac aaa gta att ata gtg gga ctg gat aac gca ggg aag acc act att 96
   His Lys Val Ile Ile Val Gly Leu Asp Asn Ala Gly Lys Thr Thr Ile
     20             25             30

15  ctt tat cag ttc tta atg aat gaa gtg gtt cat aca tct cca act ata 144
   Leu Tyr Gln Phe Leu Met Asn Glu Val Val His Thr Ser Pro Thr Ile
     35             40             45

20  gga agc aat gtt gaa gaa ata gtt gtg aag aac act cat ttt ctc atg 192
   Gly Ser Asn Val Glu Glu Ile Val Val Lys Asn Thr His Phe Leu Met
     50             55             60

25  tgg gat att ggt ggt caa gag tca ctg cgg tca tcc tgg aac acg tat 240
   Trp Asp Ile Gly Gly Gln Glu Ser Leu Arg Ser Ser Trp Asn Thr Tyr
     65             70             75             80

30  tat tca aac aca gag ttc atc att ctt gtg gtt gat agc att gac agg 288
   Tyr Ser Asn Thr Glu Phe Ile Ile Leu Val Val Asp Ser Ile Asp Arg
     85             90             95

35  gaa cga cta gct att acg aaa gaa gaa tta tac aga atg ttg gct cat 336
   Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Glu Glu Leu Tyr Arg Met Leu Ala His
     100            105            110

40  gag gat tta cgg aag gct gca gtc ctt atc ttt gcc aat aaa cag gat 384
   Glu Asp Leu Arg Lys Ala Ala Val Leu Ile Phe Ala Asn Lys Gln Asp
     115            120            125

45  atg aaa ggg tgc atg aca gca gct gaa atc tcc aaa tac ctc acc ctc 432
   Met Lys Gly Cys Met Thr Ala Ala Glu Ile Ser Lys Tyr Leu Thr Leu
     130            135            140

50  agt tca att aag gat cat ccg tgg cat att cag tcc tgc tgt gct tta 480
   Ser Ser Ile Lys Asp His Pro Trp His Ile Gln Ser Cys Cys Ala Leu
     145            150            155            160

55  aca gga gaa ggg tta tgc caa ggt cta gag tgg atg acc tcc cgg att 528
   Thr Gly Glu Gly Leu Cys Gln Gly Leu Glu Trp Met Thr Ser Arg Ile
     165            170            175

   ggt gtg aga taa 540
   Gly Val Arg

```

<210> 44

<211> 179

<212> PRT

<213> Schwein

<400> 44

```

Met Gly Leu Ile Phe Ala Lys Leu Trp Ser Leu Phe Cys Asn Gln Glu
  1             5             10             15

```

His Lys Val Ile Ile Val Gly Leu Asp Asn Ala Gly Lys Thr Thr Ile
 20 25 30
 5 Leu Tyr Gln Phe Leu Met Asn Glu Val Val His Thr Ser Pro Thr Ile
 35 40 45
 Gly Ser Asn Val Glu Glu Ile Val Val Lys Asn Thr His Phe Leu Met
 50 55 60
 10 Trp Asp Ile Gly Gly Gln Glu Ser Leu Arg Ser Ser Trp Asn Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ser Asn Thr Glu Phe Ile Ile Leu Val Val Asp Ser Ile Asp Arg
 85 90 95
 15 Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Glu Glu Leu Tyr Arg Met Leu Ala His
 100 105 110
 20 Glu Asp Leu Arg Lys Ala Ala Val Leu Ile Phe Ala Asn Lys Gln Asp
 115 120 125
 Met Lys Gly Cys Met Thr Ala Ala Glu Ile Ser Lys Tyr Leu Thr Leu
 130 135 140
 25 Ser Ser Ile Lys Asp His Pro Trp His Ile Gln Ser Cys Cys Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Glu Gly Leu Cys Gln Gly Leu Glu Trp Met Thr Ser Arg Ile
 165 170 175
 30 Gly Val Arg

35

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

45 <400> 45

aagcctgaag cttgatgat aa

22

<210> 46

50 <211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

55 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 46

caattacagc tttgctcctg tg

22

<210> 47
<211> 22
<212> DNA
5 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

10 <400> 47
atagcattga caggaacga ct 22

<210> 48
15 <211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
20 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 48
gaactgaggg tgaggtattt gg 22

25 <210> 49
<211> 332
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

30 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon 5G9 aus
BMEC aus Schweinehirn

35 <400> 49
agcggagggc gcgcccatca gcctgctccg caggggtccgg ggcgctcttt tcacctggaa 60
tattttgaaa acaattgccc tgggtcasat gttgtccttg ygtatatgtg ggacagccat 120
caccagccag tatttggcag aaaaatacaa agtgaatacg cccatgcttc agagctttat 180
caactattgc ttgctgtttc taatttatac aatgatgctg gcatttcagt caggtaataa 240
40 taacctttta tgcattcttga aaaagaaatg gtggaagtat atcctgctcg gactggcaga 300
tgtggaagct aattacctga ttgtcagagc gt 332

<210> 50
45 <211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 50
tgtatatgtg ggacagccat ca 22

55 <210> 51
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

5 <400> 51

gtccgagcag gatatacttc ca

22

<210> 52

10 <211> 2319

<212> DNA

<213> Schwein

<220>

15 <221> CDS

<222> (480)..(1466)

<400> 52

20 agtctctctt cagtccacac aagcctcaga aggggtggcct acgggttgga atcgcccctt 60

caatggcacc tcagagacat ctctgcatcg aaaggcaaac cgaacacgtc cttaaggagg 120

agacaccaca gaaacatggt tccaggatcc tttaaggacg ggaaagatag ggaagaaaag 180

25 aaacagaact ataggaaata ctttttacga tagtcaagag ggagggagac taggtccaag 240

gaggggtcag tcggctctcc ccagttaaca aaggtcattg cttttcaggt ggcataacct 300

cgattcacct caggtgctga ttttagataa ggaaccgtaa gaacctgaac cgcctcttgg 360

30 gtgtctcttc accccacgca gaagccccac tgccaagacg aagaggaaga gggcattttct 420

cctccaactc ctgctccgga ggtgccagga atattttgaa aacaattgcc ctggggtcag 479

35 atg ttg tcc ttg tgt ata tgt ggg aca gcc atc acc agc cag tat ttg 527

Met Leu Ser Leu Cys Ile Cys Gly Thr Ala Ile Thr Ser Gln Tyr Leu
1 5 10 15

40 gca gaa aaa tac aaa gtg aat acg ccc atg ctt cag agc ttt atc aac 575

Ala Glu Lys Tyr Lys Val Asn Thr Pro Met Leu Gln Ser Phe Ile Asn
20 25 30

tat tgc ttg ctg ttt cta att tat aca atg atg ctg gca ttt cag tca 623

Tyr Cys Leu Leu Phe Leu Ile Tyr Thr Met Met Leu Ala Phe Gln Ser
35 40 45

50 ggt aat aat aac ctt tta tgc atc ttg aaa aag aaa tgk tgg aag tat 671

Gly Asn Asn Asn Leu Leu Cys Ile Leu Lys Lys Lys Xaa Trp Lys Tyr
50 55 60

atc ctg ctc gga ctg gca gat gtg gaa gct aat tac ctg att gtc aga 719

Ile Leu Leu Gly Leu Ala Asp Val Glu Ala Asn Tyr Leu Ile Val Arg
65 70 75 80

55 gcg tac cag tac aca act cta acc agt gtc cag ctt ttg gat tgc ttt 767

Ala Tyr Gln Tyr Thr Thr Leu Thr Ser Val Gln Leu Leu Asp Cys Phe
85 90 95

	ggg att cct gtg ttg atg gct ctc tcg tgg ttt att ctt tat gca aga	815
	Gly Ile Pro Val Leu Met Ala Leu Ser Trp Phe Ile Leu Tyr Ala Arg	
	100 105 110	
5	tac aga gtg atc cac ttc atc gct gtg gct gtc tgt ctg ttg ggc gta	863
	Tyr Arg Val Ile His Phe Ile Ala Val Ala Val Cys Leu Leu Gly Val	
	115 120 125	
10	gga act atg gtt ggt gca gac ata tta gca ggg aga gaa gac aat tca	911
	Gly Thr Met Val Gly Ala Asp Ile Leu Ala Gly Arg Glu Asp Asn Ser	
	130 135 140	
15	ggt agt gat gtg ctg att ggt gac gtc ttg gtc ctt ctt ggg gcc tcc	959
	Gly Ser Asp Val Leu Ile Gly Asp Val Leu Val Leu Leu Gly Ala Ser	
	145 150 155 160	
20	ctc tat gca gtt tct aat gtg tgt gaa gaa tac atc gtg aag aag ctg	1007
	Leu Tyr Ala Val Ser Asn Val Cys Glu Glu Tyr Ile Val Lys Lys Leu	
	165 170 175	
25	agc cga cag gag ttt tta gga atg gtg ggc ttg ttt gga aca att atc	1055
	Ser Arg Gln Glu Phe Leu Gly Met Val Gly Leu Phe Gly Thr Ile Ile	
	180 185 190	
30	agt ggc ata cag cta ttg att gtg gaa tat aag gat att gcc agc att	1103
	Ser Gly Ile Gln Leu Leu Ile Val Glu Tyr Lys Asp Ile Ala Ser Ile	
	195 200 205	
35	cac tgg gac tgg aaa att gcc cta ctg ttt gta gca ttt gcc ctc tgt	1151
	His Trp Asp Trp Lys Ile Ala Leu Leu Phe Val Ala Phe Ala Leu Cys	
	210 215 220	
40	atg ttt tgc ctg tac agc ttc atg cca ctg gtg att aaa gtc act agt	1199
	Met Phe Cys Leu Tyr Ser Phe Met Pro Leu Val Ile Lys Val Thr Ser	
	225 230 235 240	
45	gcc act tct gtc aac ctg ggc atc ctg aca gct gac ctc tat agt ctt	1247
	Ala Thr Ser Val Asn Leu Gly Ile Leu Thr Ala Asp Leu Tyr Ser Leu	
	245 250 255	
50	ttc ttt gga ctc ttc ctg ttt ggc tat aag ttc tcg gga ctc tac atc	1295
	Phe Phe Gly Leu Phe Leu Phe Gly Tyr Lys Phe Ser Gly Leu Tyr Ile	
	260 265 270	
55	ctg tcc ttc gct gtc atc atg gtg ggg ttc att ctg tac tgt tcc acg	1343
	Leu Ser Phe Ala Val Ile Met Val Gly Phe Ile Leu Tyr Cys Ser Thr	
	275 280 285	
60	ccg acg cgc acg gca gag ccg gct gaa agc agc gtg cca cca cca gtc	1391
	Pro Thr Arg Thr Ala Glu Pro Ala Glu Ser Ser Val Pro Pro Pro Val	
	290 295 300	
65	acc agc atc ggg atc gac aac ctg ggc ctg aag ctt gag gag aac ctc	1439
	Thr Ser Ile Gly Ile Asp Asn Leu Gly Leu Lys Leu Glu Glu Asn Leu	
	305 310 315 320	
70	ccg gag acc cac tcc gtg gcc tta tag ctggagaaga aggacacac	1486
	Pro Glu Thr His Ser Val Ala Leu	
	325	

atgtactgcg gctttctggg aagccgggag ctatcacctg aataaagcag agcctgttgc 1546
 ctgctgaggg gacacttgga aaatgatcag atgcagagtg aacactctgg agcactggat 1606
 5 tggctctagt ggtagattt tatgaaggaa tacaaatcaa tgtatcaaag gtagaagtac 1666
 caaagtagag cagaagctaa ggcaaggatt gtgtttttgt gtgttttaggg accaatgtgt 1726
 10 attaacgtca gggagacaag gtgtgaggcc cacactgggg tctcagaggc acaagatggg 1786
 aaagcaggat ggggtggata ctcaggtgtg aggcagcctc aggacagggc ctgaaagcag 1846
 gctgtccagg taggctgggtt ggtcggggag gggaagagca tcccaggatg gtttgggatt 1906
 15 aggtttgctc agttggaggc atctgagttc tgtcctgctg aggcagtgat tgtctcatgg 1966
 gctagacgag gtctggtgac tgattgcgta catcaggaag atggagggtg cagcactgga 2026
 20 gaaatcctga gatacaagtg tagaaccata gaagcagcac agcggatcct tctcccaatt 2086
 gttactacac taatcttagc aaataatgtg ccatgagatt tttatgagac ttcttcaaaa 2146
 caaagttaac aggaagcatc attatgatat caactaccaa gcagtatgcc mctttacaca 2206
 25 gatgctctat gtaaattttg ggggggtaaa aatataataa aggaatcgag ggtaaattgtt 2266
 catattatta aaaatttttg atttcataga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2319

<210> 53
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Schwein

<400> 53
 Met Leu Ser Leu Cys Ile Cys Gly Thr Ala Ile Thr Ser Gln Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Lys Tyr Lys Val Asn Thr Pro Met Leu Gln Ser Phe Ile Asn
 20 25 30
 Tyr Cys Leu Leu Phe Leu Ile Tyr Thr Met Met Leu Ala Phe Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Asn Asn Leu Leu Cys Ile Leu Lys Lys Lys Xaa Trp Lys Tyr
 50 55 60
 45 Ile Leu Leu Gly Leu Ala Asp Val Glu Ala Asn Tyr Leu Ile Val Arg
 65 70 75 80
 Ala Tyr Gln Tyr Thr Thr Leu Thr Ser Val Gln Leu Leu Asp Cys Phe
 85 90 95
 Gly Ile Pro Val Leu Met Ala Leu Ser Trp Phe Ile Leu Tyr Ala Arg
 100 105 110
 50 Tyr Arg Val Ile His Phe Ile Ala Val Ala Val Cys Leu Leu Gly Val
 115 120 125
 Gly Thr Met Val Gly Ala Asp Ile Leu Ala Gly Arg Glu Asp Asn Ser
 130 135 140
 55 Gly Ser Asp Val Leu Ile Gly Asp Val Leu Val Leu Leu Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Leu Tyr Ala Val Ser Asn Val Cys Glu Glu Tyr Ile Val Lys Lys Leu
 165 170 175

Ser Arg Gln Glu Phe Leu Gly Met Val Gly Leu Phe Gly Thr Ile Ile
 180 185 190
 Ser Gly Ile Gln Leu Leu Ile Val Glu Tyr Lys Asp Ile Ala Ser Ile
 195 200 205
 5 His Trp Asp Trp Lys Ile Ala Leu Leu Phe Val Ala Phe Ala Leu Cys
 210 215 220
 Met Phe Cys Leu Tyr Ser Phe Met Pro Leu Val Ile Lys Val Thr Ser
 225 230 235 240
 Ala Thr Ser Val Asn Leu Gly Ile Leu Thr Ala Asp Leu Tyr Ser Leu
 10 245 250 255
 Phe Phe Gly Leu Phe Leu Phe Gly Tyr Lys Phe Ser Gly Leu Tyr Ile
 260 265 270
 Leu Ser Phe Ala Val Ile Met Val Gly Phe Ile Leu Tyr Cys Ser Thr
 275 280 285
 15 Pro Thr Arg Thr Ala Glu Pro Ala Glu Ser Ser Val Pro Pro Pro Val
 290 295 300
 Thr Ser Ile Gly Ile Asp Asn Leu Gly Leu Lys Leu Glu Glu Asn Leu
 305 310 315 320
 Pro Glu Thr His Ser Val Ala Leu
 20 325

<210> 54

25 <211> 407

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Klon 5E7 aus
BMEC aus Schweinehirn

<400> 54

acagactgag atttagatgt ttcattggcc gtctgaagag gtgtggcttg tcttttatat 60
 35 agagatctac attataaaat actccgtgaa gaaaaacaca ccaaacgaaa gagatttttaa 120
 gaatttggca cagttagtcc ctttgtgtaa tctgaactct tctagctgct gaatatcttg 180
 aagtcattcc tgttactga agtctttctg attgagctgg ttgaatactt tgaaaaaatga 240
 tgcgttctag ctgttgaaat ggatttccca ataggggttc ctgcatatta cctgtatagt 300
 agctctatgc atatgtttct gtgcatgctc tctaccagtg tgtaagggtg cactgtattt 360
 40 taactgttgc acttgtcaac tttcaataaa gcatataaaa tgttggt 407

<210> 55

<211> 1905

45 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: CDNA von
TSC-22 aus BMEC aus Schweinehirn

<220>

<221> CDS

<222> (243)..(677)

55

<400> 55

agtctagagc ctagtggagc ccggctgccg acctgggagc cttctccgca cagcagttgg 60
 atctgcatct tcccgaatc gccaaagcccc agaagccggg tttctttcaa ttaggggttg 120

tgttttctgt tcctccctga gccgcataaa gctagaagat ttttatctag ctcaaacaag 180
 gcctctagaa ttccctcttt ttttaatttt ttccctgcgag ggtgtttttt ggctgcaatt 240
 5 gc atg aaa tcc caa tgg tgt aga cca gtg gcg atg gat cta gga gtt 287
 Met Lys Ser Gln Trp Cys Arg Pro Val Ala Met Asp Leu Gly Val
 1 5 10 15
 10 tac caa ctg aga cat ttt tca att tct ttc ttg tca tcc ttg ctc ggg 335
 Tyr Gln Leu Arg His Phe Ser Ile Ser Phe Leu Ser Ser Leu Leu Gly
 20 25 30
 15 act gaa aac gcc tct gtg aga ctt gac aat agc tct tct ggt gca agt 383
 Thr Glu Asn Ala Ser Val Arg Leu Asp Asn Ser Ser Ser Gly Ala Ser
 35 40 45
 20 gtg gta gct att gac aac aaa atc gag caa gct atg gat ctg gtg aaa 431
 Val Val Ala Ile Asp Asn Lys Ile Glu Gln Ala Met Asp Leu Val Lys
 50 55 60
 25 agc cat ttg atg tat gca gtt aga gag gaa gtg gag gtc ctc aaa gag 479
 Ser His Leu Met Tyr Ala Val Arg Glu Glu Val Glu Val Leu Lys Glu
 65 70 75
 30 caa atc aaa gaa cta ata gag aaa aat tcc cag ctg gag cag gaa aac 527
 Gln Ile Lys Glu Leu Ile Glu Lys Asn Ser Gln Leu Glu Gln Glu Asn
 80 85 90 95
 35 aat ctg ctg aag aca ctg gcc agt ccg gag cag ctt gcc cag ttc cag 575
 Asn Leu Leu Lys Thr Leu Ala Ser Pro Glu Gln Leu Ala Gln Phe Gln
 100 105 110
 40 gcc cag ctg cag act ggc tcc ccg ccg gcc acc aca cag ccc cag ggg 623
 Ala Gln Leu Gln Thr Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Gln Pro Gln Gly
 115 120 125
 45 acc aca cag ccc ccg gcc cag cca gcg tcc cag ggc tca gga ccg acc 671
 Thr Thr Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ala Ser Gln Gly Ser Gly Pro Thr
 130 135 140
 50 gcg tag cctcctaggc cccccgcgag aactggctgc tgctgtctga accgactgac 727
 Ala
 145
 55 cgaccgaccg accggagagg atgtgctggg ggaggggggg gtccgcctcc accacggtca 787
 cccatTTcaa tgctcagctg cgaaagagac gtgagactga catatgccat tatctctttt 847
 60 ttccagtatt aaacctcat gtgcttttgg cttgaagaag tttcttagtt gggcgactta 907
 aaggTTaacc agagaattag catggatgta ctgggacctc atgcagcggg gcagatccgt 967
 65 gagaaatggt ttcatTCatg ctgaggagct gtgtgccttt ccgccccctcc cctgctccgc 1027
 70 accccacct ccacccccac cctaccct accccccact ccgagaggtc gtcgtgcttg 1087
 75 ctctggcgt gctgcgcgca gtccccaagc cgtggagcgc cactggactc tcctctcgt 1147

cctccccac gaggaaccgg aaaggggggt gaaagtcaag accgaagctt catctcacct 1207
 cggaggagggg gaaacgtagg tcattgtaca cgttgacgac tgtcaccaaa atccataaaa 1267
 5 aaacgaaaca aaaaccaag agtactgtgc ctcttcccaa agcaagggat gacgcggggac 1327
 tattccagag tgactgaagg gtgacaggta gctggcacct cggctatcaa cgtgaaggyg 1387
 gttttgctca ttgtatatatt gtgtatgtag gtgtaactat tttgtacaat agaggactgt 1447
 10 aactactatt tagcttgtac agactgagat ttagatgttt cattggccgt ctgaagargt 1507
 gtgggttgtc ttttatatag agatctacat tataaaatac tccgtgaaga aaaacacacc 1567
 15 aaacgaaaga gattttaaga atttggcaca gttagtccct ttgtgtaatc tgaactcttc 1627
 tagctgctga atatcttgaa gtcasttctt gttcactgaa gtctttctga ttgagctggt 1687
 tgaatacttt gaaaaatgat gcgttctagc tgttgaaatg gatttcccaa taggggttcc 1747
 20 tgcatattac ctgtatagta gctctatgca tatgtttctg tgcatgctct ctaccagtt 1807
 gtaaggtgtc actgtatttt aactgttgca cttgtcaact ttcaataaag catataaaat 1867
 25 gttggtvmaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1905

<210> 56

<211> 144

30 <212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: CDNA von
TSC-22 aus BMEC aus Schweinehirn

35 <400> 56

Met	Lys	Ser	Gln	Trp	Cys	Arg	Pro	Val	Ala	Met	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr
1				5					10					15	
Gln	Leu	Arg	His	Phe	Ser	Ile	Ser	Phe	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr
			20					25					30		
40	Glu	Asn	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	Asp	Asn	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Ser
			35					40					45		
Val	Ala	Ile	Asp	Asn	Lys	Ile	Glu	Gln	Ala	Met	Asp	Leu	Val	Lys	Ser
			50			55					60				
His	Leu	Met	Tyr	Ala	Val	Arg	Glu	Glu	Val	Glu	Val	Leu	Lys	Glu	Gln
45			65			70				75				80	
Ile	Lys	Glu	Leu	Ile	Glu	Lys	Asn	Ser	Gln	Leu	Glu	Gln	Glu	Asn	Asn
				85					90					95	
Leu	Leu	Lys	Thr	Leu	Ala	Ser	Pro	Glu	Gln	Leu	Ala	Gln	Phe	Gln	Ala
			100					105					110		
50	Gln	Leu	Gln	Thr	Gly	Ser	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Gln	Pro	Gln	Gly
			115					120					125		
Thr	Gln	Pro	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala	Ser	Gln	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Ala
			130				135					140			

55

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

5

<400> 57

aagaggtgtg gcttgtcttt ta

22

10

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

15

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 58

tttttcaaag tattcaacca gctc

24

20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.